

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**E.A.P. DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA**

**Determinación de la frecuencia del gen CTX-M que  
codifica  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido (BLEE) EN  
Escherichia coli uropatógenas aisladas en el Hospital  
Guillermo Almenara de marzo a mayo del año 2012**

**TESIS**

**Para optar al título profesional de Biólogo Microbiólogo**

**Parasitólogo**

**AUTORA**

**Méndez Ruiz Ema Alexandra**

**ASESORA**

**Ruth García de la Guarda**

**Lima – Perú**

**2015**

## DEDICATORIA

Para mi mamá, quien me crió, cuidó y empujó a donde estoy,  
sin ella nada sería posible.

Para mi papá, el hombre más extraordinario del mundo, de mi  
mundo, a quien espero algún día poder igualar.

A mi tía Sara, quien es aun más que sangre, a sus jugos y  
ensaladas que me hacían cobrar ánimo.

A mi Ukito y Paloma, que son compañeros de vida y a quienes  
espero haberles sido ejemplo.

A la señora Amelia y Jenny, por creer en mí y darme su apoyo  
para continuar.

A mis lindas compañeras, Pilar, Rocío y Melina sin quienes  
este viaje de conocimientos hubiera sido más tedioso de lo  
habitual.

A Dios, gracias a quien fue, es y será simplemente todo.

## AGRADECIMIENTOS

Al Doctor José Díaz, del hospital Guillermo  
Almenara Irigoyen quien proveyó de las cepas.

A la Profesora Mg. Ruth García de la Guarda, mi  
asesora y guía en este trabajo.

Al laboratorio de Microbiología Molecular y  
Biotecnología, por permitirme hacer uso de sus  
equipos y más.

Al señor Blgo. Oscar Vásquez, mi jefe, quien a lo  
largo de todos estos años me brindó el apoyo  
requerido para finalizar mis estudios y realizar esta  
tesis.

## ABREVIATURAS

- BLEA: betalactamasa de amplio espectro
- BLEE: betalactamasa de espectro extendido
- CLSI: *Clinical and Laboratory Standard Institute* (antes *The National Committee for Clinical Laboratory Standards* – NCCLS).
- EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético
- ITU: Infección del tracto urinario
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
- UPEC: *Escherichia coli* uropatógena

# ÍNDICE

	Página
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. MARCO TEÓRICO .....	6
2.1. GENERALIDADES DE LAS INFECCIONES URINARIAS.....	6
2.2. ETIOLOGÍA DE LAS INFECCIONES URINARIAS.....	10
2.3. <i>Escherichia coli</i> .....	13
2.4. FACTORES DE VIRULENCIA DE <i>Escherichia coli</i> .....	14
2.4.1. Adhesinas.....	18
2.4.2. Toxinas.....	19
2.4.3. Sideróforos.....	20
2.4.4. Cápsula.....	20
2.5. RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS .....	22
2.5.1. Modificación enzimática del antibiótico .....	23
2.5.2. Bombas de expulsión.....	23
2.5.3. Cambios en la permeabilidad de la membrana externa .....	24
2.5.4. Alteraciones del sitio de acción .....	24
2.6. CLASIFICACIÓN DE LAS ENZIMAS BETALACTÁMICAS.....	26
2.6.1. Clasificación según Ambler .....	26
2.6.1.1. Clase A.....	27
2.6.1.2. Clase B.....	27

2.6.1.3.	Clase C.....	27
2.6.1.4.	Clase D.....	27
2.6.2.	Clasificación según Bush-Jacobi-Medeiros.....	28
2.6.2.1.	Grupo 1.....	28
2.6.2.2.	Grupo 2.....	28
2.6.2.3.	Grupo 3.....	29
2.6.2.4.	Grupo 4.....	29
2.7.	PRODUCCIÓN DE ENZIMAS BETALACTÁMICAS.....	30
2.7.1.	Betalactamasas cromosómicas .....	31
2.7.2.	Betalactamasas plasmídicas.....	32
2.7.2.1.	Betalactamasas de amplio espectro (BLEA).....	32
2.7.2.2.	Betalactamasas tipo TEM resistentes a los inhibidores (IRT).....	32
2.7.2.3.	Betalactamasas tipo AmpC.....	33
2.7.2.4.	Betalactamasas tipo carbapenemasas.....	33
2.7.2.5.	Betalactamasas de espectro extendido(BLEE).....	34
2.7.2.5.1.	BLEE tipo TEM .....	36
2.7.2.5.2.	BLEE tipo SHV.....	36
2.7.2.5.3.	BLEE tipo OXA .....	37
2.7.2.5.4.	BLEE tipo CTX-M.....	37
III.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	40

IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
4.1. Materiales .....	41
4.2. Metodología .....	42
4.2.1. Toma de muestra.....	42
4.2.2. Tipo de estudio .....	43
4.2.3. Población muestral.....	43
4.2.4. Conservación de cepas.....	43
4.2.5. Confirmación de la identificación de cepas.....	43
4.2.6. Confirmación de la susceptibilidad antibiótica.....	44
4.2.7. Extracción de plásmidos.....	45
4.2.8. Electroforesis para comprobar presencia de plásmidos.....	46
4.2.9. Preparación de iniciadores.....	47
4.2.10. Amplificación por PCR de los genes que codifican $\beta$ -lactamasas.....	48
4.2.11. Electroforesis de los productos de PCR.....	49
V. RESULTADOS.....	50
VI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	59
VII. CONCLUSIONES.....	65
VIII. RECOMENDACIONES.....	66
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

## RESUMEN

De todas las infecciones, las del tracto urinario (ITU) son después de las infecciones de las vías respiratorias, las más frecuentes en la atención primaria. Los patógenos que causan estas infecciones son varios, pero el más común es *Escherichia coli*. Entre los antibióticos usados en el Perú para la terapia de las infecciones urinarias destacan las cefalosporinas y el mecanismo más importante de resistencia a estos antibióticos en las enterobacterias es la producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEE). Hay varios tipos de BLEE, entre ellas las TEM, SHV y OXA, pero en 1989 se encontró un aislado clínico de *Escherichia coli* que producía una enzima diferente a éstas a la que se le denominó CTX-M por su actividad hidrolítica preferente sobre cefotaxima. Las BLEE de tipo CTX-M han adquirido relevancia epidemiológica por su dispersión intra y extrahospitalaria. Se han hecho investigaciones que demuestran que los aislados de *E. coli* productores de BLEE tipo CTX-M son prevalentes en Sudamérica, sin embargo en el Perú son pocos los estudios realizados al respecto. El objetivo de este estudio fue determinar a nivel fenotípico y molecular la presencia y frecuencia de genes que codifica BLEE del tipo CTX-M en cepas de *E. coli* provenientes de urocultivos. En un estudio observacional. Se colectaron 50 cepas de *E. coli* provenientes de urocultivos del Hospital Guillermo Almenara Irigoyen (HNGAI) entre marzo y mayo del 2012. Se confirmó la identificación de los aislados y se realizó el antibiograma mediante la técnica de Kirby - Bauer. La determinación de la producción de BLEE se hizo siguiendo los criterios del CLSI así como el método de Jarlier. Las plásmidos se extrajeron con el kit Pure Yield <sup>™</sup> Plasmid Miniprep System, Novagen. El gen *blaCTX-M* se evidenció mediante amplificación por PCR, visualizándose mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1%. Se determinó que el 58.3% de *E. coli* aisladas de urocultivos eran productoras de BLEE, de las cuales el 85.7% presentaron el gen de resistencia *blaCTX-M* en plásmidos. Se concluye que el principal mecanismo de resistencia en *Escherichia coli* aisladas de urocultivos del HNGAI, entre marzo y mayo del 2012, es la producción de BLEE, siendo el tipo CTX-M de elevada frecuencia (85.7%). Esto concuerda con lo reportado en otros países y es un conocimiento que aporta información valiosa que debe tomarse en cuenta para vigilar el progreso de la resistencia a los antibióticos en nuestro país.

**Palabras clave:** BLEE, *blaCTX-M*, ITU, PCR y UPEC.



## ABSTRACT

Of all infections, urinary tract infection (UTI) are after the infections of the respiratory tract, the most common in primary care. The pathogens that cause these infections are several, but the most common is *Escherichia coli*. Among the antibiotics used in Peru for therapy of urinary tract infections include cephalosporins and the most important mechanism of resistance to these antibiotics in enterobacteria is the production of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs). Several types of ESBL, including TEM, SHV and OXA, but in 1989 a clinical isolate of *Escherichia coli* producing a different enzyme which these was called CTX-M for its preferential hydrolytic activity on cefotaxime was found. The CTX-M type ESBLs have acquired its epidemiological relevance and intra-hospital spread. Research has been done showing that isolates of *E. coli* producing CTX-M type ESBLs are prevalent in South America, but in Peru are few studies about it. The objective of this study was to determine phenotypic and molecular level the presence and frequency of genes encoding ESBL CTX-M type strains of *E. coli* from urine cultures. In an observational study. 50 strains of *E. coli* from urine cultures of the Hospital Guillermo Almenara Irigoyen (HNGAI) between March and May 2012 were collected. Identification of isolates is confirmed and sensitivity is performed by the technique of Kirby - Bauer. The determination of ESBL production was made following CLSI criteria and the method of Jarlier. The plasmids were extracted with the kit Pureyield™ Plasmid Miniprep System, Novagen. The blaCTX-M gene evidenced by PCR amplification, displayed by horizontal electrophoresis in agarose gel 1%. It was determined that 58.3% of *E. coli* isolated from urine cultures were ESBL producers, 85.7% of which presented resistance gene in plasmids blaCTX-M. It is concluded that the main mechanism of resistance in *Escherichia coli* isolated from urine cultures of HNGAI between March and May 2012, is the production of ESBL, the CTX-M being high frequency (85.7%) type. This is consistent with those reported in other countries and is knowledge that provides valuable information that should be considered to monitor the progress of antibiotic resistance in our country.

Keywords: ESBL, blaCTX-M, ITU, PCR and UPEC.

## I. INTRODUCCIÓN

De todas las infecciones, las del tracto urinario son después de las infecciones de las vías respiratorias las más frecuentes en la atención primaria (Leones *et al.*, 2002), siendo esta patología una de las más comunes tanto en pacientes ambulatorios como en pacientes hospitalizados.

En una encuesta epidemiológica realizada en España en el año 2007 a 6545 mujeres, se determinó que el 37% de ellas habían sufrido cuando menos un episodio de infección del tracto urinario (ITU) y de ellas el 32% había presentado más de dos episodios de ITU. Esto no solo tiene importancia clínica, sino además tiene una repercusión económica y no sólo por el coste sanitario que representa sino también por las horas/hombre que se pierden, siendo un problema más frecuente en mujeres que en varones; en la población de adultos mayores es la infección más frecuente (Antón *et al.*, 2006). En las mujeres gestantes el riesgo se multiplica por quince (Planells *et al.*, 2008) y el factor de riesgo en este tipo de paciente se debe a que la ITU representa un peligro para el feto en desarrollo.

Debemos tener clara la definición de infección del tracto urinario. Se denomina como infección del tracto urinario o ITU a la colonización microbiana de la orina (Pastor, 2007). Las ITU se clasifican en bajas y altas. Las ITU bajas afectan la vejiga y uretra, y pueden ser: uretritis, síndrome uretral agudo, cistitis y prostatitis. Las ITU altas afectan la pelvis y parénquima renal y se le conoce como pielonefritis aguda (Clemente *et al.*, 1998). Las ITU son monomicrobianas en más del 95% de los casos, pero, si existen alteraciones anatómicas de las vías urinarias, no es infrecuente que la infección sea polimicrobiana.

Los patógenos que causan estas infecciones son varios, entre los más frecuentes se encuentran *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, entre otros, siendo en la mayoría de estas infecciones urinarias el patógeno por excelencia *Escherichia coli*, que afecta a pacientes de todas las edades (Ramos *et al.*, 2006).

Dentro de los antibióticos usados en el Perú en la terapia de las infecciones urinarias los que más destacan por su uso empírico son las cefalosporinas de primera generación y quinolonas en cistitis agudas no complicadas, también para pielonefritis agudas no complicadas y también en ITU complicadas (Echevarría-Zarate *et al.*, 2006).

En el Perú, para los casos pediátricos, los antibióticos de primera línea son las cefalosporinas de primera y segunda generación, también nitrofurantoína y ácido nalidíxico por vía oral y por vía parenteral las cefalosporinas de tercera generación (Chiarella *et al.*, 1993). De todas maneras los antibióticos que se recetan de manera empírica resulta del estudio de los patrones de sensibilidad a antibióticos usados en cada localidad; como sabemos no siempre la terapia empírica tiene buenos resultados y esta es una de las causas del aumento de la resistencia antimicrobiana en nuestro medio, ni cotrimoxazol ni ampicilina o amoxicilina son elecciones adecuadas para este tipo de terapia, por los elevados porcentajes de resistencia (Miyahira, 1994).

En la última década ha habido un importante aumento de la resistencia de *E. coli* a la ampicilina, cefalosporinas de primera generación y cotrimoxazol que oscilan entre el 47% y 70% sin diferencias significativas entre los de origen comunitario o nosocomial; en general, las cepas de *E. coli* son resistentes a la ampicilina, lo que invalida a este antibiótico para su uso clínico (Gómez *et al.*, 2005; Ochoa *et al.*, 2005).

Las betalactamasas de espectro extendido (BLEE) derivan de mutaciones en las betalactamasas plasmídicas clásicas que modifican bien su espectro, ampliándolo a cefalosporinas de tercera generación y monobactamas, bien su susceptibilidad a la inhibición por ácido clavulánico y derivados, haciéndolas resistentes a su acción. Las características de estas betalactamasas hacen que los métodos que permitían detectar y caracterizar a las betalactamasas clásicas no sean válidas para ellas, porque pueden pasar desapercibidas mediante el antibiograma clásico, ya que con frecuencia no presentan valores de concentración mínima inhibitoria (CIM) elevadas de las cefalosporinas de tercera generación, situadas claramente en la categoría de resistente, por lo que requieren de métodos específicos de detección y no se deducen con facilidad, esto lleva a que aparezcan como activos los antibióticos frente a los cuales, en realidad, el microorganismo alberga algún mecanismo de resistencia, e implica por tanto un alto riesgo de fracaso terapéutico, a pesar de la posible sensibilidad ~~ib~~ mediante los métodos clásicos (Muñoz y García-Rodríguez, 2003).

Estas enzimas confieren resistencia a un gran número de antibióticos de uso común como penicilina, ampicilina, cefalosporinas de cualquier generación (excepto cefamicinas), aztreonam, en un porcentaje no desdeñable de casos también a los betalactámicos asociados a inhibidores de betalactamasas, aminoglucósidos, tetraciclinas y clotrimoxazol (García-Hernández ~~ta~~, 2011).

En los últimos años se han producido avances significativos en la patogenia de éstas infecciones, los patrones de sensibilidad de las bacterias que ocasionan estas infecciones han variado enormemente debido al uso indiscriminado de los antibióticos.

Dentro de los diferentes tipos de resistencia que se presenta, la producción de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido es uno de los principales mecanismos de resistencia a cefalosporinas de tercera generación en las enterobacterias (Castro *et al.*, 2008).

Más aún, las infecciones por *E. coli* productoras de BLEE han experimentado importantes cambios epidemiológicos en los últimos tiempos habiéndose incrementado las infecciones en pacientes procedentes de la comunidad y sobre todo en aquellos de instituciones sanitarias. Mientras que en los años 80s y principios de los 90s la mayoría de las BLEE eran del tipo *bla* TEM o *bla* SHV, actualmente las más frecuentes en la mayoría de los países, incluyendo España, son las CTX-M (García-Hernández *et al.*, 2011).

Luego del conocimiento de las diferentes formas de adquirir la resistencia a antibióticos como las mutaciones y la transferencia horizontal de genes de especies diferentes a través de transposones, plásmidos e integrones (Japoni *et al.*, 2008) estos genes BLEE no son la excepción, ya que la mayoría se encuentran a nivel de plásmidos lo que explicaría la facilidad con la que se transfieren de manera horizontal propagándose en gran manera.

Es importante considerar que la prevalencia de cepas resistentes varía de un país a otro y de institución a institución (Al-Jasser, 2006) y en el Perú hay pocos estudios al respecto (Rivera-Jacinto *et al.*, 2008). El incremento de la resistencia antimicrobiana es cada día una realidad más preocupante y nuestro país no escapa de esa realidad, por lo tanto es una situación que se debe vigilar de manera consciente.

En el Perú, el problema del aumento de resistencia antimicrobiana en los aislados clínicos es cada vez más preocupante, entre éstos la resistencia de tipo BLEE es de importancia por su diseminación intrahospitalaria así como en la comunidad. En el Perú son pocos los estudios realizados sobre la prevalencia de los tipos de BLEE producidas por *E. b* uropatógenas, sin embargo, hay reportes que indican que en Sudamérica las BLEE de tipo CTX-M son las más prevalentes (Muñoz y García-Rodríguez, 2003). En esta tesis se ha investigado la presencia y frecuencia de genes que codifican BLEE del tipo CTX-M en *E. b* provenientes de pacientes con ITU aislados en el HNGAI.

Los resultados obtenidos son un aporte importante para que los clínicos puedan proponer un tratamiento empírico adecuado a los pacientes y mejorar el programa de vigilancia epidemiológica de la resistencia antimicrobiana y de esta manera desarrollar e implementar estrategias adecuadas para prevenir y detener su diseminación.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. GENERALIDADES DE LAS INFECCIONES URINARIAS

La Infección del Tracto Urinario (ITU) es la colonización microbiana de la orina (Pastor, 2007).

La infección urinaria se define como la invasión microbiana del aparato urinario que sobrepasa la capacidad de los mecanismos de defensa del huésped, produce alteraciones morfológicas o funcionales y una respuesta inmunológica no siempre evidenciable. De acuerdo a la evolución, manifestación clínica y foco afectado, las infecciones urinarias se denominan y clasifican en acepciones distintas. En primer lugar, la forma de inicio y la evolución caracteriza las infecciones agudas, crónicas y recurrentes; en segundo lugar, las manifestaciones clínicas pueden ser internas y aparentes (sintomáticas) o totalmente inexistentes pero insidiosas (asintomáticas); en tercer lugar, la infección puede asentar en el aparato urinario sin ninguna anomalía subyacente o por el contrario, con anomalías anatomoestructurales o funcionales que facilitan, condicionan y perpetúan la infección (Dalet ~~tal~~, 2007).

Otra manera de clasificar las ITUs es en bajas y altas. Las ITUs bajas afectan la vejiga y uretra, y pueden ser: uretritis, síndrome uretral agudo, cistitis y prostatitis. Las ITUs incluyen los síndromes debidos a la inflamación del parénquima renal (pielonefritis aguda o crónica) y los procesos supurativos locales (absceso renal); además la presencia de fiebre, dolor lumbar o puño percusión positiva indican infección del riñón (Clemente ~~tal~~, 1998; Pigrau ~~tal~~ . 2002; Echevarría-Zárate ~~tal~~ , 2006).

Otra manera de clasificar las infecciones urinarias desde un punto de vista clínico es la que las distingue entre complicadas y no complicadas. Una ITU es complicada cuando se da en pacientes con patología metabólica previa o con anomalía anatomoestructural o funcional del tracto urinario (presencia de cálculos, obstrucción, vejiga neurógena o cuerpo extraño); el embarazo, la diabetes, el trasplante renal, la edad avanzada, la hospitalización, la hipertrofia prostática y diversas enfermedades metabólicas e inmunológicas también pueden hacer complicada una ITU; también se incluyen en este grupo a las infecciones urinarias ocasionadas por un patógeno resistente a antibióticos (Echevarría-Zárate ~~et al~~ 2006). La infección urinaria no complicada es la cistitis en la mujer sana no embarazada.

Cuando las ITU se producen de forma recurrente se pueden clasificar en recidivas o reinfecciones. Las recidivas representan aproximadamente el 20% de las recurrencias, donde la bacteriuria se debe al mismo germen que produjo la primera infección, y suele ocurrir tras finalizar el tratamiento previo. Esto puede ser debido a la persistencia del microorganismo en el tracto urinario, a un tratamiento antibiótico inadecuado, a alguna anomalía genitourinaria o la ubicación del germen en un lugar inaccesible al antibiótico. Las reinfecciones, son más frecuentes que las recidivas y se producen por un germen distinto aunque a veces puede deberse al mismo microorganismo que persiste en la vagina o intestino y da lugar mucho tiempo después a la infección inicial (Blasco ~~et al~~ , 2006).

Las infecciones urinarias afectan a ambos sexos y a cualquier grupo etario. Constituyen la patología infecciosa más frecuente en el ambiente hospitalario y ocupan la segunda plaza en el ámbito extrahospitalario después de las infecciones



respiratorias. Se han identificado varios factores como posibles causas pre disponentes de infecciones urinarias, destacando entre ellos el tipo de colonización intestinal, el sexo, la edad, la raza, el nivel socioeconómico, la climatología, los determinantes genéticos y la presencia de la patología subyacente (Dalet ~~tal~~ ., 2007; Leones ~~tal~~ , 2002).

La incidencia de ITU se relaciona estrechamente con las variables epidemiológicas de edad y sexo; excepto en los primeros meses de vida, la infección urinaria es más frecuente en mujeres hasta los 50 – 65 años; a partir de esta edad la incidencia en los varones aumenta progresivamente hasta igualar a las de las mujeres. La asociación con el sexo femenino es tan intensa que se ha estimado que hasta un 50% de las mujeres sufrirán al menos un episodio de ITU en algún momento de su vida (Martínez, 2001).

En los recién nacidos hasta los 3 meses afecta más a los varones que a las mujeres, el 3% de las niñas prepuberales y el 1% de los varones de edad similar presentan ITUs. La recurrencia es de 30% en mujeres siendo en varones menos frecuente y circunscrita principalmente al primer año de vida (Cavagnaro, 2005), hasta el 10% de las mujeres experimenta, por lo menos, un episodio de infección urinaria en un año, hasta un 60% experimenta un episodio en algún momento de su vida y los episodios recurrentes se ven en un 5% de las mujeres en algún período de su vida (Álvarez, 2007; Seija ~~tal~~ , 2010).

Las infecciones urinarias son muy frecuentes; en los Estados Unidos generan 7 millones de consultas al año y un coste asistencial que supera los 1.000 millones de dólares, se estima que aproximadamente 150 millones de personas alrededor

del mundo sufren esta patología, lo cual aún en sus formas más mínimas representan altos costos sanitarios. Además las ITUs producen malestar aún en sus formas más leves y conllevan a una morbilidad y mortalidad significativa en sus formas más complicadas (Martínez, 2001).

Jiménez y sus colaboradores evaluaron 1 132 casos de infecciones nosocomiales en una clínica privada de la ciudad de Medellín, Colombia, encontrando que la infección del tracto urinario alcanzaba un 16,3% de la muestra estudiada (Jiménez *et al* , 2010). La incidencia de la infección urinaria ha ido cambiando en la última década. Según el estudio EPINE (Estudio de Prevalencia de las Infecciones Nosocomiales en España 2004-2007) la prevalencia parcial de IU comunitaria aumentó de un 2.02% en 1991 a un 2.38% en el 2003; mientras que la prevalencia parcial de las IU nosocomial pasó de un 2.68% en 1990 a un 1.56% en el 2003, manteniéndose estable desde esa fecha (Andreu *et al*, 2011).

En el 2008 en el Perú, se realizó un estudio en el hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins para determinar la prevalencia de las infecciones intrahospitalarias dentro de las cuales, las infecciones urinarias alcanzaron 24.4% del total de todas infecciones intrahospitalarias (Hidalgo, 2011). Mientras que en el 2009, se realizó un estudio similar en el hospital Nacional Almanzor Aguinaga (Chiclayo) donde las infecciones urinarias alcanzaron el 8.8% del total de las infecciones intrahospitalarias (Castañeda-Díaz *et al* , 2011).

## 2.2. ETIOLOGÍA DE LAS INFECCIONES URINARIAS

Los es patógenos capaces de producir infecciones del tracto urinario son diversos: bacterias, hongos; en niños: virus, como es el caso de la cistitis por adenovirus; al este de África y en el Medio Oriente son frecuente las ITU debidas a parásitos, como *Shistosoma haematobium* y por *Trichomonas vaginalis* ; sin embargo en América las ITU por estos parásitos son casos muy raros (Rondon *et al.*, 2011).

Sin embargo la etiología de las infecciones urinarias varía con cada una de estas circunstancias. El 95%-98% de las ITU ambulatorias son bacterianas, siendo las restantes debidas a protozoos y hongos. De este porcentaje de infecciones causadas por bacterias, son en su mayoría las ITU monomicrobianas y sólo un pequeño porcentaje son polimicrobianas. Las infecciones urinarias polimicrobianas son excepcionales y por lo general se observan en pacientes con sondas o en pacientes con fístulas que comunican las vías urinarias con el intestino o vagina. En general, las infecciones causadas por bacterias, gran parte son infecciones monomicrobianas, la mayoría de las cuales son causadas por es que constituyen parte de la flora microbiana normal del tubo digestivo del propio paciente que alcanza el tracto urinario por vía ascendente, ocasionando una bacteriuria asintomática, cistitis o pielonefritis; estas bacterias son principalmente de la familia Enterobacteriaceae, entre las que se encuentran: *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Proteus mirabilis*, entre otros. También son frecuentes *Pseudomonas aeruginosa* y cocos grampositivos como *S. saprophyticus*, *Enterococcus spp.* y *Streptococcus agalactiae*, siendo *Escherichia coli* entre todas las bacterias en general, la más frecuente por excelencia (Satura, 2004;Antón *et al.*, 2006; Ramos *et al.*, 2006; De Castaño *et al.*, 2007;Planells *et al.*, 2008).

En infecciones hospitalarias de pacientes con enfermedad urológica subyacente o portadores de sondas, la frecuencia relativa de *Escherichia coli* disminuye y se aíslan *Pseudomonas* spp., otros bacilos gramnegativos no fermentadores, enterobacterias como *Klebsiella* spp., *Serratia* spp. y levaduras, además cabe señalar que suelen tratarse de cepas más resistentes a los antibióticos. Infecciones por *Staphylococcus aureus* o *Salmonella* spp. indican generalmente infección renal metastásica en el curso de una bacteriemia. Cabe recordar que *Mycobacterium tuberculosis* también puede producir infección renal por vía hematógena.

*E. coli*, también es una de las causas más frecuente de ITU adquirido intrahospitalariamente (nosocomial), sin embargo otros gramnegativos, tales como *Proteus vulgaris*, *Klebsiella* sp; y *Pseudomonas aeruginosa*, se vuelven más importantes en frecuencia que en las infecciones extrahospitalarias. Además difieren en su sensibilidad antibiótica, ya que son resistentes a muchas drogas de uso frecuente. Sin embargo esta sensibilidad antibiótica es variable de ciudad en la ciudad de hospital en hospital, de acuerdo a la utilización de los antibióticos, tal como ha sido descrito en varios estudios (Miyahira, 1994).

En estudios a nivel mundial las ITUs intrahospitalarias constituyen aproximadamente un 40% del total de las infecciones intrahospitalarias, mostrando que el 92% de éstas son monomicrobianas y solo el 8% son polimicrobianas; los agentes causales más frecuentes *E. coli*, *Enterococcus* sp. *Klebsiella* sp., *Pseudomonas aeruginosa* y *Proteus* sp. En el Perú, constituyen el 24.4% de las infecciones intrahospitalarias (Hidalgo et al., 2011).

*E. b* es también la causa más frecuente de ITU adquirido en forma extrahospitalaria (en la comunidad), alcanzando ente 70-90% según las series, tanto en adultos como en la población pediátrica. En la actualidad parece ser que *Staph sap* es una causa común de ITU en mujeres jóvenes. Algunos estudios de Europa sugieren que *S. sap* puede ser responsable de 25-35% de las infecciones urinarias agudas, mientras que en USA ha sido encontrado sólo en 5-10% de infecciones. Sin embargo, esta frecuencia podría ser mayor ya que muchos laboratorios no realizan las pruebas específicas en los cultivos positivos a estafilococo coagulasa-negativo (contaminantes), para detectar la presencia de *S. sap* (Miyahira, 1994).

En un estudio realizado en la Universidad Nacional de Colombia se encontró que el más frecuentemente aislado corresponde a: *Es b* con el 89.9%, seguido de *Psp* con el 5.1%, *Klebsiella spp.* con el 3.7%, *Enterobacter spp.* con el 1%, *Citrobacter spp.* con el 1% y finalmente *Staphylococcus saprophyticus* con el 0.3% (Álvarez, 2007).

El patógeno aislado con mayor frecuencia en la comunidad es *Escherichia coli* provenientes de infecciones de vías urinarias (Ochoa *et al.*, 2005).

En resumen, como evidencia la bibliografía, el patógeno aislado con mayor frecuencia en infecciones del tracto urinario sin importar el origen es *Escherichia coli* y el hospital Guillermo Almenara Irigoyen no es ajeno a ello; en el año 2005 este hospital en conjunto con el hospital Edgardo Rebagliati Martins participaron de un trabajo en el cual el 2.9% fueron *Escherichia coli* BLEE (caracterizadas genotípicamente como TEM o SHV mas no como CTX-M) (Morales *et al.*, 2005).

### 2.3. *Escherichia coli*

*E. coli* pertenece a la familia enterobacteriaceae, a la tribu Escherichieae y al género *E. coli*, morfológicamente son bastones rectos, algunas cepas presentan cápsula o microcápsula, poseen flagelos peritricos, no forman esporas, puede presentar plásmidos o sobrevivir sin él, son gramnegativos, anaerobios facultativos y presentan tanto un metabolismo fermentativo como oxidativo, es un organismo quimioorganotrófico, oxidasa negativo y catalasa positiva, su temperatura óptima de crecimiento es 37°C, crece a un pH óptimo entre 6.0 y 7.0, no producen sulfuro de hidrógeno, gelatinasa negativo, no crece en KCN, puede usar el acetato como única fuente de carbono mas no el citrato, fermenta glucosa y otros carbohidratos con producción de piruvato, el cual es posteriormente convertido en los ácidos láctico, acético y fórmico; la mayoría de cepas pueden fermentar lactosa pero esta capacidad puede estar latente o ausente, reduce el nitrato a nitrito, reacciona positivamente con rojo de metilo (Abbott *et al*, 2003; Koneman *et al*, 2006).

Su distribución es universal, suele ser comensal en el ser humano y otros animales aunque ocasionalmente se vuelve patógena ocasionando diarreas, infecciones urinarias, meningitis, etc. (Koneman *et al*, 2006).

Se distinguen varias cepas según su capacidad patógena o virulencia llamadas también virotipos: *E. coli* enteropatógena (ECEP), enterotoxigénica (ECET), enteroinvasiva (ECEI), enterohemorrágica o verotoxigénica (ECEH), enteroagregativa (ECEA), uropatógena (ECUP) y de adherencia difusa (ECAD). Existen cerca de 700 serotipos (se basan en sus antígenos O, H y K) aunque la

mayoría asociada a diarreas. Para poder ser patógenas poseen factores de virulencia que les permite ocasionar la enfermedad (Koneman ~~et al~~, 2006).

#### **2.4. FACTORES DE VIRULENCIA DE *Escherichia coli***

La patogenicidad es la capacidad de un microorganismo para causar enfermedad.

Esta capacidad se debe a la expresión de múltiples factores de virulencia. La virulencia se refiere al grado de patogenicidad dentro de un grupo o especie de microorganismo, asimismo también, la virulencia se refiere a la capacidad del micro-organismo para causar enfermedad, dada por la severidad clínica de la infección, el nivel anatómico y por las complicaciones de la infección. Este concepto de virulencia o patogenicidad en el tracto urinario infiere que no todas las especies de bacterias son igualmente capaces de inducir inflamación en la vía urinaria (Miyahira, 1994).

Las bacterias han desarrollado métodos sofisticados para percibir el medio ambiente en el que se hallan y regular la expresión de los genes involucrados en la virulencia. La transducción de la señal de dos componentes se refiere a pares de proteínas reguladoras que funcionan de modo secuencial en detectar alteraciones en el ambiente exterior y en efectuar respuestas adaptativas en el organismo. Explicándolo a nivel molecular, esto sucede por transferencia de grupos fosfato desde las proteínas sensoras a las proteínas efectoras; el estado de la fosforilación de las proteínas efectoras regula la fuerza y la duración de la respuesta por unión a los promotores en el ácido nucléico que permite la expresión

de los genes bacterianos que codifican los factores de virulencia (Koneman ~~et al~~ , 2006).

Estos factores no son necesarios para la replicación vegetativa del microorganismo y tampoco es necesario para el comensalismo, pero contribuye en el aumento de la eficiencia para colonizar superficies específicas del hospedador, en la evasión de las defensas inmunológicas o en el daño directo a sus células y tejidos lo que resulta en el establecimiento de la enfermedad (Johnson, 2002).

La virulencia abarca dos características de un microorganismo: su infectividad que es la capacidad para iniciar una infección y la gravedad de la afección producida (Koneman ~~et al~~ , 2006).

Los factores de virulencia bacterianos son componentes estructurales o productos producidos por bacterias que permiten al microorganismo perjudicar al hospedero de alguna manera, algunos están asociados con las células mientras que otros pueden ser extracelulares.

Dentro de los factores de virulencia se incluyen las adhesinas, toxinas, sideróforos y sistemas de secreción, bacteriosinas, que posean plásmidos transmisibles y el intercambio genético por transducción o conjugación, entre otros (Johnson, 1991; Blanco ~~et al~~ , 2002; Emödy ~~et al~~ , 2003).

Los plásmidos son elementos de ADN extra-cromosómico que constituyen entre el 1% y >10% del genoma de muchas especies bacterianas que suelen existir como moléculas circulares de ADN de doble hebra. Se replican intracelularmente



de manera autónoma y, aunque en la mayoría de las ocasiones no son esenciales para la viabilidad de la célula, contienen genes que confieren distintas propiedades como la resistencia a antibióticos, virulencia o actividades metabólicas. Los plásmidos se clasifican según sus características, algunas de ellas con importancia epidemiológica: tamaño, rango del hospedador (presencia en una o diferentes especies y géneros), número de copias por célula, capacidad de transferirse por conjugación y grupo de incompatibilidad. Los plásmidos están constituidos por una región constante que incluye determinantes genéticos para sus funciones esenciales (replicación, mantenimiento y transferencia) y una región variable de ADN heterólogo (ej. genes de resistencia). La caracterización del ADN heterólogo es útil para determinar la ecología y la epidemiología de los mismos en respuestas a distintas presiones selectivas, en el caso de los determinantes de resistencia a la utilización de antimicrobianos (Coll ~~tal~~, 2005).

Después de varias evaluaciones mediante técnicas de electroforesis de enzimas (MLEE) y de secuenciación de sus genes (MLST), en *E. b* se han identificado cuatro grandes grupos filogenéticos: A, B1, B2 y D. Las cepas de *E. b* uropatógenos, derivan principalmente del grupo filogenético B2 y en menor medida del D y albergan genes que codifican factores extraintestinales de virulencia que promueven funciones patogénicas entre estas tenemos la adherencia, evasión a los mecanismos de defensa del huésped, adquisición de hierro, invasión celular, resistencia a antibióticos mediada por transposones y plásmidos, etc., siendo tanto más virulentas cuanto más factores concurren en ellas. Los genes responsables de los factores de virulencia se encuentran en el cromosoma bacteriano agrupados en fragmentos de ADN muy particulares denominados “islas de patogenicidad” o PAI (Andréu ~~tal~~, 2011).

Aunque las diferentes formas de ITUs comparten unos mecanismos patogénicos y una etiología similar, cada una de las diferentes formas de ITU es el resultado de un complejo proceso, resultado del equilibrio que se establece entre una serie de factores de virulencia dependientes del microorganismo y de una serie de condiciones propias del huésped.

Dentro de los factores de virulencia que son más importantes se encuentran: las adhesinas, las toxinas, los sideroforos, las capsulas y los genes de resistencia a antibióticos que suelen encontrarse en islas de patogenicidad.

A continuación se hablará más detalladamente de los factores de virulencia de *E. coli* uropatógenas:

Los factores de virulencia asociados con *E. coli* , se muestra en la tabla N°1.

**Tabla N° 1.** Factores de virulencia relacionados con *E. coli* uropatógenas.

<ul style="list-style-type: none"><li>• Expresión de serotipos O:K:H *</li><li>• Polisacárido capsular K</li><li>• Adherencia a célula uroepitelial *</li><li>• Resistencia a actividad bactericida sérica</li><li>• Producción de hemolisina *</li><li>• Producción de aerobactina *</li><li>• FACTORES POSIBLES:<ul style="list-style-type: none"><li>- Tiempo de generación bacteriana en orina</li><li>- Factor ureteropléjico bacteriano</li><li>- Producción de colicina V</li><li>- Fermentación de salicina</li></ul></li></ul>
---

\* Asociados con pielonefritis

#### 2.4.1. Las adhesinas

El primer paso en el establecimiento de un proceso infeccioso reside en la capacidad de un microorganismo para entrar en el huésped e iniciar la infección. Como ya se sabemos, el mecanismo habitual de producción de las ITUs es el ascenso de los microorganismos desde la zona periuretral hasta la vejiga urinaria en caso de las cistitis aguda, hasta el parénquima prostático en el caso de la prostatitis aguda y/o hasta la pelvis renal a través de los uréteres en el caso de las pielonefritis agudas. Por lo tanto el primer paso en la patogénesis de las ITUs es la adherencia del microorganismo patógeno al epitelio del tracto urinario, lo que le va a permitir a la bacteria permanecer en el tracto urinario a pesar del efecto de arrastre del flujo urinario; las adhesinas al permitir un estrecho contacto entre los microorganismos y el epitelio urinario del huésped, exponen al urotelio a altas concentraciones de productos tóxicos o inflamatorios de origen bacteriano y esto aumenta la actividad de estos componentes sobre el epitelio del huésped. La adherencia de las cepas pielonefritogénicas, es considerablemente mayor al observado en cepas de cistitis; mientras que un nivel mucho menor de adherencia se encuentra en cepas fecales de *E. Cb* (Miyahira, 1994).

Las fimbrias o pili de los microorganismos se consideran los principales ligandos responsables de esta adhesión, aunque también existen adhesinas no fimbriales. Las fimbrias son apéndices filamentosos que parten de la superficie de la bacteria, en el caso de *E. b* a mayoría de las fimbrias son proteicas que se unen a receptores específicos situados en las membranas de las células epiteliales; cuya biogénesis requiere 14 genes que se

encuentran codificados en el plásmido de virulencia denominado factor de adherencia de EPEC o EAF (Emödy ~~et al~~ , 2003).

Hay tipos de adhesinas y entre estas tenemos: fimbrias del tipo 1, fimbrias P, adhesinas no fimbriales.

En *E. b* uropatógenas la fimbria P es la que está presente en la mayoría de cepas aisladas de pacientes con pielonefritis y urosepsis, más del 90% de las cepas pielonefritogénicas expresan fimbria P, en contraste con solo 16% de las cepas fecales de *E. b* ; otra adhesina importante es la fimbria S que está asociada especialmente con cepas causantes de septicemias y meningitis, aunque muchas de las UPEC expresan tanto la fimbria P como la S al mismo tiempo y dichas fimbrias están codificadas en los operones cromosómicos *pp* y *h* respectivamente (Blanco ~~et al~~ , 2002).

Las fimbrias Curli están en el 50% de las cepas UPEC y se expresan óptimamente a temperatura ambiente por lo que se les ha correlacionado con la colonización de la región perineal, lo que posibilitaría una ITU subsecuentemente (Emödy ~~et al~~ , 2003).

#### **2.4.2. Toxinas**

Además de las adhesinas, las cepas de UPEC secretan proteínas específicas (toxinas) cuyo papel en la patogénesis de las ITUs es aún controvertido aunque se consideran entre estos el aumento de la disponibilidad y la captación del hierro, la invasión celular por medio de la lisis y ruptura de la capa mucina y del epitelio en caso de las UPEC,

ejemplos de estas toxinas son las hemolisinas, en especial la  $\alpha$ -hemolisina que es producida habitualmente por cepas de *E. b* causantes de ITUs lisa los eritrocitos ocasionando la liberación de hierro y otros nutrientes necesarios para el crecimiento bacteriano (Blanco *et al* , 2002); la toxina autotransportadora tipo 1 (SAT-1) de carácter proteolítico cuya presencia se ha asociado con cepas pielonefriticas de *E. b* y que parecen tener un efecto toxico frente a líneas celulares de origen renal y vesical; el factor citotóxico necrotizante conocido también como CNF-1, que actúan favoreciendo la invasión tisular, induce la apoptosis y disminuye la fagocitosis de los polimorfos (Emödy *et al* , 2003).

#### **2.4.3. Sideróforos**

*E. b* precisa de hierro para su metabolismo aeróbico y para los procesos de crecimiento y multiplicación bacteriana.

A este respecto, las bacterias patógenas productivas han desarrollado formas de obtenerlo del medioambiente o de los tejidos del huésped, en los cuales el hierro libre se mantiene en bajas concentraciones por estar unido a las proteínas transferrina y lactoferrina, estas bacterias recogen el hierro por medio de estos sideroforos que son moléculas pequeñas que funcionan como quelantes de hierro de elevada afinidad; por lo tanto la producción de sideróforos se considera un factor de virulencia (Koneman *et al* , 2006).

#### **2.4.4. Cápsula**

La mayor parte de *E. b* Extra-intestinal Patogénicas (ExPEC) poseen una capsula de polisacáridos que difiere de la cápsula que poseen las cepas

comensales. Esta cápsula interfiere en los procesos de fagocitosis y protegen al microorganismo frente a la opsonización y la lisis mediada por complemento.

Aunque los plásmidos por si mismos no son factores de virulencia, los genes que codifican muchos de los productos celulares bacterianos responsables de la virulencia suelen residir en ellos. Los factores R (plásmidos que contienen genes que codifican la resistencia a los agentes antimicrobianos) pueden considerarse de virulencia porque la adquisición de resistencia a los agentes antimicrobianos fomenta el crecimiento continuado y la diseminación de las infecciones bacterianas a pesar de las intervenciones terapéuticas. Algunas bacterias también contienen plásmidos que codifican pili sexuales y transferencias cromosómicas.

Estos dos factores le permiten a un microorganismo transferir material genético (por medio de la introducción de un plásmido, de un cromosoma o de ambos) a otros organismos. Los plásmidos también pueden portar genes que codifican antígenos de colonización, resistencia al suero, quelación y transporte de hierro, producción de toxinas y hemolisinas, y mecanismos de supervivencia intracelular indefinida. Los plásmidos que contienen genes de resistencia han sido descritos en muchos gramnegativos (todo los *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Pasteurella*, *Campylobacter*, *Haemophilus*, *Neisseria* y *Bacteroides*) y grampositivos (*Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Clostridium* y *Corynebacterium*) (Koneman *et al.*, 2006).

## 2.5. RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

La resistencia a los antimicrobianos se puede definir como una □ condición microbiológica caracterizada por la capacidad natural o adquirida, por parte de una cepa bacteriana de permanecer refractaria a los efectos bacteriostáticos o bacteriosidas de un agente antimicrobiano” (Bush ~~et al~~ , 1995).

La resistencia emerge principalmente debido a la presión selectiva generada por los antibióticos usados; estos separan subpoblaciones bacterianas que adquieren ventajosas mutaciones de resistencia o determinantes móviles de resistencia adquirida tales como plásmidos o transposones.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera que la prescripción no adecuada y abusiva de los antibióticos, la prolongación de los planes más allá de lo necesario, la irregularidad en la toma de las drogas y a la automedicación son una de las principales causas del incremento de la resistencia bacteriana.

Al contrario de lo que pasa con la etiología, el desarrollo de resistencias en los uropatógenos es constante y diverso según las zonas geográficas, dependiendo en gran medida del consumo de antimicrobianos, aunque la mayoría de datos publicados sobredimensionan los porcentajes de resistencias, ya que se realizan en base a infecciones en las que se solicita cultivo, correspondientes a infecciones complicadas o resistentes al tratamiento (Andreu ~~et al~~ , 2011).

Las enterobacterias tienen muchos mecanismos de resistencia a antibióticos a su disposición y la expresión de estos mecanismos pueden llevar al fracaso terapéutico por lo tanto tiene suma importancia conocer los mecanismos de

resistencia más prevalentes en estos microorganismos y estos se pueden clasificar en cuatro categorías:

#### **2.5.1. Modificación enzimática del antibiótico**

Las bacterias expresan enzimas que son capaces de crear cambios en la estructura del antibiótico haciendo que este pierda su funcionalidad; en esta categoría se encuentran las  $\beta$ -lactamasas siendo las más prevalentes y estas enzimas son capaces de hidrolizar el anillo betalactámico que poseen los antibióticos de esta familia (Sanders y Sanders, 1992).

La producción de betalactamasas es el principal mecanismo de resistencia de las enterobacterias, estas enzimas realizan la hidrólisis del anillo betalactámico del antibiótico de tal forma que lo inactivan permitiendo a la bacteria sobrevivir; el grupo de antibióticos betalactámicos comprende a las penicilinas, cefalosporinas y monobactámicos, estos actúan inhibiendo las transpeptidasas encargadas de realizar los procesos finales de la síntesis de la pared celular la que se les llama también proteínas de unión a la penicilina (PBP) (Koneman ~~et al~~ , 2006).

#### **2.5.2. Bombas de expulsión**

Este mecanismo opera tomando el antibiótico del espacio periplasmático y expulsándolo al exterior, con lo cual evitan que llegue a su sitio de acción, este mecanismo es frecuentemente utilizado por las bacterias Gram negativas (Koneman ~~et al~~ , 2006).



### 2.5.3. Cambios en la permeabilidad de la membrana externa

Por medio de este mecanismo la bacteria genera cambios en la bicapa lipídica, aunque la permeabilidad de la membrana se ve alterada, principalmente debido a las porinas; las porinas son proteínas que forman canales llenos de agua embebidos en la membrana externa que regulan la entrada de algunos elementos, entre ellos, los antibióticos y de esta manera no se permite el paso de estos agentes al espacio periplasmático (Vila ~~et al~~, 2007).

### 2.5.4. Alteraciones del sitio de acción

Las bacterias pueden alterar el sitio donde el antibiótico se une a la bacteria para interrumpir una función vital de esta, este mecanismo es principalmente utilizado por las bacterias gram positivas, las cuales generan cambios estructurales en los sitios de acción de los antibióticos betalactámicos a nivel de proteínas unidoras de penicilinas.

Los Gram-negativos como *E. b* inactivan los betalactámicos produciendo enzimas betalactamasas que están codificadas en forma extracromosomal (Morales et al, 2005; Rodríguez et al., 2006; Pino et al., 2007; Barcelona et al., 2008; Castro et al., 2008).

Las betalactamasas de espectro extendido se encuentran presentes en mayor porcentaje en *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* pero también se encuentran en otras enterobacterias (Koneman ~~et al~~, 2006).

La diseminación de la resistencia sobreviene como consecuencia de la difusión de clones o determinantes genéticos móviles, los cuales están directamente favorecidos por la homogeneidad e intensidad de la exposición en determinada población de pacientes. La modificación de la flora endógena, debido principalmente al tratamiento antimicrobiano, lleva a la colonización con bacterias resistentes como sustituto exógeno.

En los últimos años se han producido avances significativos en la patogenia de las mismas, cambios importantes en los patrones de sensibilidad a los antibióticos en las principales especies patógenas que causan infección urinaria, con un incremento progresivo de las infecciones causadas por enterobacterias productoras de betalactamasa de espectro extendido (BLEE), debido al consumo excesivo de antibióticos, especialmente de las cefalosporinas y fluoroquinolonas, han favorecido el aumento de *E. b* con patrón de multirresistencia debido a la producción o hiperproducción de betalactamasas, especialmente las betalactamasas de espectro extendido (Gómez ~~tal~~, 2005); lo que ha condicionado cambios en el tratamiento empírico de estas infecciones.

Dentro de los diferentes tipos de resistencia que se presenta, la producción de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido es uno de los principales mecanismos de resistencia a cefalosporinas de tercera generación en las enterobacterias (Castro ~~tal~~, 2008), alcanzando porcentajes muy elevados de BLEE (+), siendo *E. b* la que presenta hasta un 64.9% de BLEE (+) del total de las cepas aisladas (Sánchez, 2004) y este porcentaje va creciendo a medida que va transcurriendo el tiempo y de manera más alarmante en

infecciones del tracto urinario adquiridas en la comunidad (IUAC) donde las cepas BLEE (+) alcanzan el 66% en *E. coli* (Andrade *et al.*, 2006).

Del total de cepas aisladas el 68% son betalactamasas positivas, y de este total el 82.5% pertenece a *E. coli* y el 29% a *Klebsiella pneumoniae* (Hernández *et al.*, 2003). En el mundo, se observa un aumento de *Escherichia coli* productor de BLEE, lo cual se ha reportado en España (Caro *et al.*, 2007), en Argentina (Muzachiodi y Ferrero, 2005), Países Árabes (Kadder y Kumar, 2005), tanto a nivel hospitalario como en la comunidad (Horcajada y Fariñas, 2005).

## 2.6. CLASIFICACIÓN DE LAS ENZIMAS BETALACTÁMICAS

Hay dos maneras de clasificar las enzimas betalactamasas de espectro extendido una que se llama la clasificación de Ambler que clasifica estas enzimas de acuerdo a su estructura molecular y a la secuencia de aminoácidos, y la clasificación según Bush-Jacobi-Madeiros, que se basa en los sustratos que las enzimas hidrolizan.

### 2.6.1. Clasificación según Ambler

Según esta clasificación, que fue introducida por Ambler en 1980, reconoce cuatro tipos moleculares designados con letras desde la A hasta la D. Las enzimas de tipo A, C y D tienen serina en su sitio activo y las de tipo B tienen 1 o 2 moléculas de zinc en su zona activa o también conocidas como las metalo-beta-lactamasas y que son inhibidos por EDTA (Cavalieri *et al.*, 2010).

**2.6.1.1. Clase A:** Estas se encuentran tanto en bacterias Gram positivas como Gram negativas. Pueden ser de origen cromosómico o plasmídico.

**2.6.1.2. Clase B:** Estas enzimas difieren de las otras betalactamasas en que usan el ion zinc para unir el residuo histidina o cisteína con el grupo carboxilo de la unión amida de la mayoría de las penicilinas, cefalosporinas y carbapenemes. Esta familia es la más heterogénea y en ella se distinguen tres grupos diferentes de metalo-betalactamasas: B1, B2 y B3; las que pertenecen a la B1 y B3 engloban las enzimas con amplio espectro de acción que actuarían frente a la mayoría de los betalactámicos menos frente a los monobactámicos, mientras que las que pertenecen a B2 son carbapenemasas las cuales presentan escasa acción frente a penicilinas y cefalosporinas (Gupta, 2007).

**2.6.1.3. Clase C:** A este grupo pertenece la enzima ampC y estas enzimas confieren resistencia a las oximinocefalosporinas, 7-a-metoxicefalosporinas y no son afectadas por los inhibidores (Gupta, 2007).

**2.6.1.4. Clase D:** A este grupo pertenecen las serin-oxacilinasas especialmente activas frente a oxacilina.

Según la clasificación de Ambler las BLEEs corresponden a la clase molecular A (grupos funcionales 2be) y D (grupo funcional

2de). La mayoría de los autores coinciden en que las enzimas plasmídicas que estructuralmente se relacionan con las betalactamasas de clase C de algunas enterobacterias (*Cbb* ~~ii~~ *Ebb bcae* , *Mgan ella morganii*) no deben considerarse estrictamente BLEEs, porque estas enzimas no hidrolizan con eficacia las cefalosporinas anfóteras (como cefepima) y además no se inhiben por inhibidores de serina, con algunas excepciones para tazobactam (Ambler, 1980).

## 2.6.2. Clasificación según Bush-Jacobi-Madeiros.

La clasificación según Bush-Jacobi-Madeiros postulada en el año 1995 se basa en los sustratos que las betalactamasas hidrolizan y la inhibición de su actividad por compuestos como el ácido clavulánico, EDTA, aztreonan u oxacilina. Esta clasificación divide a las enzimas en 4 grupos (ver tabla n° 2).

**2.6.2.1. Grupo 1:** Cefalosporinas que no son claramente inhibidas por el ácido clavulánico o sulbactam pero que son inhibidas por el aztreonan y cloxacilina; la mayor parte de ellas son de origen cromosómico e hidrolizan principalmente la cefalotina y la cefaloridina. Las enzimas de este grupo se correlacionan con la clase molecular C.

**2.6.2.2. Grupo 2:** Las penicilasas, cefalosporinasas, carbapenemasas y betalactamasas de amplio espectro que generalmente son inhibidas por inhibidores de beta-lactamasas como el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam, que a su vez tiene subgrupos que se

definen de acuerdo a las tasas de hidrólisis de carbenicilina o cloxacilina (oxacilina) producidas por las penicilinasas del Grupo 2. Estas enzimas están correlacionadas con las de clase A o D de la clasificación molecular de Ambler.

**2.6.2.3. Grupo 3:** Las metalo-beta-lactamasas que hidrolizan penicilinas, cefalosporinas y carbapenems que son inhibidos por EDTA y p-cloromercuribenzoato (pCMB) y no por inhibidores estructuralmente relacionados a los beta-lactámicos. Son las únicas betalactamasas que pertenecen a la clase B de la clasificación molecular de Ambler.

**2.6.2.4. Grupo 4:** Las penicilinasas que no son inhibidas adecuadamente por el ácido clavulánico y hasta ahora no se han podido clasificar en ningún grupo de clase molecular (Bush *et al.*, 1995; Jacoby y Muñoz-Price, 2005).

**Tabla N° 2.** Clasificación de Bush, Jacoby y Medeiros.

GRUPO	CLASE MOLECULAR	SUSTRATO DE PREFERENCIA	INHIBICIÓN POR AC. CLAVULANICO	INHIBICIÓN POR EDTA	ENZIMAS REPRESENTATIVAS
1	C	Cefalosporinas	-	-	Enzimas AmpC de Gram-negativos MRI-1
2 <sup>a</sup>	A	Penicilinas	+	-	Penicilinasa de Gram-positivos
2b	A	Penicilinas y Cefalosporinas	+	-	TEM-1,TEM-2,SHV-1
2be	A	Penicilinas, Cefalosporinas de espectro expandido y monobactams	+	-	TEM-3 a TEM-26, SHV-2 a SHV-6 K-1
2br	A	Penicilinas	+/-	-	TEM-30 a TEM-36. TRC-1
2c	A	Penicilinas y carbenicilinas	+	-	PSE-1. PSE-3, PSE-4
2d	D	Penicilinas y Cloxacilinas	+/-	-	OXA-1 a OXA-11, FSE-2
2e	A	Cefalosporinas	+	-	Cefalosporinasas de <i>P. vulgaris</i>
2f	A	Penicilinas, Cefalosporinas y Carbapenems	+	-	MNC-A de <i>E. cloacae</i> , Sme-1 de <i>S. marcescens</i>
3	B	La mayoría de $\beta$ -lactamasas incluyendo Carbapenems	-	+	L-1 de <i>S. maltophilia</i> CcrA de <i>B. fragilis</i>
4	No Determinado	Penicilinas	-	?	Penicilinasas de <i>B. cepacia</i>

Fuente: Bush ~~et al~~ ., 1995.

## 2.7. PRODUCCIÓN DE ENZIMAS BETALACTAMASAS

Como sabemos estas enzimas están codificadas por genes y estos pueden encontrarse en el cromosoma de la bacteria o en los segmentos de DNA extra cromosómico, denominados plásmidos los que son responsables de la diseminación de la mayoría de las betalactamasas.

Los genes que codifican algunas betalactamasas son transportados por transposones y muchos genes se encuentran en integrones, los cuales muy a

menudo incluyen genes que codifican otros mecanismos de resistencia a otros antibióticos.

Las principales betalactamasas responsables de la resistencia en los bacilos Gram negativos son las del tipo AmpC y las betalactamasas plasmídicas de amplio espectro (BLEA) y de espectro extendido (BLEE) (Levison, 2002).

### 2.7.1. Betalactamasas cromosómicas

Las betalactamasas cromosómicas pueden ser de producción constitutiva, ya sea de alto o bajo nivel, o inducible (Livermore, 1995).

*E. b* posee una betalactamasa de tipo AmpC constitutiva de bajo nivel la cual no contribuye a la resistencia frente a los antibióticos betalactámicos, sin embargo *Phaginos* y otras enterobacterias presentan una betalactamasa tipo AmpC inducible, que en ausencia del antibiótico está reprimida y en presencia del antibiótico se expresa a este estado se le denomina “desreprimido reversible” (Anderson *et al.*, 1996).

También puede ocurrir que algunas mutaciones en los genes reguladores provoquen la expresión de grandes cantidades de la enzima constitutiva y a este estado se le denomina “desreprimido estable” y estas variantes mutantes son resistentes a cefalosporinas de tercera generación, aztreonam, cefamicinas, penicilinas de amplio espectro e inhibidores de betalactamasas (Levison, 2002).



### **2.7.2. Betalactamasas plasmídicas**

Estas son diferentes a las betalactamasas cromosómicas, pero en algunos casos existe un solapamiento, como es el caso de la SHV-1 que normalmente es una betalactamasa plasmídica pero en *Klebsiella pneumoniae* es cromosómica (Jacoby y Muñoz-Price, 2005). Las betalactamasas plasmídicas incluyen betalactamasas de amplio espectro (BLEA), las betalactamasas de espectro extendido (BLEE), las betalactamasas resistentes a los inhibidores (IRT), las cefamicinas AmpC y las carbapemenasas.

#### **2.7.2.1. Betalactamasas de amplio espectro (BLEA)**

A las primeras  $\beta$ -lactamasas aisladas se les denominó  $\beta$ -lactamasas de amplio espectro (TEM-1, TEM-2, SHV-1) que ofrecían resistencia a la ampicilina y amoxicilina pero no a las cefalosporinas de tercera generación (Castro, 2008). Dentro de este grupo están incluidas TEM-1, TEM-2, SHV-1, estas pertenecen a la clase molecular A y son inhibidas por el ácido clavulánico y también está incluida la tipo OXA. Ninguna de estas betalactamasas hidrolizan cefalosporinas de tercera generación, cefamicinas, monobactams o carbapenemas (Jacoby y Muñoz-Price, 2005).

#### **2.7.2.2. Betalactamasas tipo TEM resistentes a los inhibidores (IRT)**

Estas enzimas derivan de las betalactamasas clásicas y se caracterizan por conferir resistencia a amino-carboxi y ureidopenicilinas, no les afecta los inhibidores de betalactamasa y tampoco tienen actividad sobre el resto de betalactámicos; se les

denominó IRT porque en su mayoría derivan de TEM-1 y TEM-2, aunque también se han descrito derivadas de SHV-1 (Chaibi y Farzaneh, 1996).

#### **2.7.2.3. Betalactamasas tipo AmpC**

Las cepas que producen betalactamasas plasmídicas de espectro extendido tradicionales no confieren resistencia a las cefamicinas; sin embargo en los últimos años se han descrito betalactamasas plasmídicas que confieren resistencia no solo a cefalosporinas de tercera generación sino también a cefamicinas y se les conoce como cefamicinasas plasmídicas (Nelson y Elisha, 1999).

**Papanicolaou y cols., 1990**, aportaron la primera evidencia de una betalactamasa plasmídica de clase C, los cuales describieron la transmisión de la resistencia a cefamicinas mediada por una enzima denominada MIR-1, que presenta propiedades bioquímicas de una betalactamasa de clase 1 y el gen que codifica esta enzima presenta una analogía de un 90% con el gen AmpC de *E. coli* ~~bae~~ *bcae* (Papanicolaou ~~et al~~, 1990; Nelson y Elisha, 1999).

Desde entonces hasta ahora se han descrito numerosas betalactamasas plasmídicas AmpC.

#### **2.7.2.4. Betalactamasas tipo carbapenemasas**

Esta resistencia es poco frecuente, estas enzimas son activas frente a las oximino-cefalosporinas, cefamicinas y carbapenemes. La

resistencia a los carbapenemes puede deberse a alteraciones en la permeabilidad, expulsión, inactivación por betalactamasas o a modificaciones de las dianas (PBP) (Poirel ~~ta~~, 2004).

#### **2.7.2.5. Betalactamasas de espectro extendido (BLEE)**

Son enzimas que hidrolizan a las cefalosporinas de amplio espectro que contienen una cadena lateral de oximino, entre las cuales están incluidas la ceftazidima, ceftriaxona, cefotaxima y también aztreonam. No actúan sobre cefamicinas ni carbapenemes, son inhibidas por el ácido clavulánico, el sulbactam o tazobactam (Paterson, 2003).

El primer aislamiento de BLEE documentado tuvo lugar en Alemania en el año 1983 a partir de una cepa de *Klebsiella ozaenae* y recibió el nombre se SHV-2 (Sánchez, 2004).

Las BLEE, por lo tanto, se clasifican dentro de ese gran grupo 2b, constituyendo el subgrupo 2be (clase molecular A), aunque algunas de ellas también se clasifican en grupos distintos al 2be; por ejemplo ciertas oxacilinasas del grupo 2d, clase molecular D. Sin embargo hasta la fecha se han descrito más de cien variantes distintas de BLEE, derivadas de las betalactamasas TEM-1 o TEM-2 y más de cincuenta derivadas de SHV-1 (Sánchez, 2004).

Además de este tipo de betalactamasas tenemos la del tipo CTX-M que se describieron en el año 1989, estas derivan originalmente de

las betalactamasas cromosómicas de distintas especies del género *Kluyvera*, pertenecientes a la clase molecular A, y se caracterizan por conferir resistencia de alto nivel a cefuroxima, cefotaxima, cefepime y ceftriaxona aunque en un menor grado contra ceftazidima y estas últimas se han incrementado en gran manera en los últimos años y se encuentran fundamentalmente en cepas de *Salmonella* enterica serovariedad *Thyphimurium* y en *Escherichia coli* aunque también se encuentran en otras enterobacterias como *K. pneumoniae* y *Proteus mirabilis* y en otros gramnegativos como *Acinetobacter baumannii*, *A. hydrophila* y *Vibrio cholerae*; y ciertamente su creciente diseminación es un hecho preocupante (Sánchez, 2004; Castro *et al.*, 2008).

Las principales BLEE clásicas derivan de las betalactamasas de amplio espectro que pertenecen al grupo 2b (TEM-1, TEM-2 y SHV-1); y son originadas debido a mutaciones puntuales en la estructura del gen que las codifica, estas betalactamasas 2b poseen actividad penicilinasa y son en su mayoría *a priori* e inhibibles por ácido clavulánico (Sánchez, 2004, Barcelona *et al.*, 2008; Barrera *et al.*, 2005; Goussard y Courvalin, 1999; Rodríguez *et al.*, 2006).

Actualmente se conocen más de trescientos tipos de BLEE, que se clasifican en base a su secuencia amino-ácídica, la mayoría de ellas descritas por primera vez en países Europeos (García-Hernández *et al.*, 2011).

Dentro de las BLEE tenemos varios tipos, a continuación los principales grupos:

**2.7.2.5.1. BLEE tipo TEM:** Las BLEE tipo TEM son derivadas de las betalactamasas de amplio espectro TEM-1 y TEM-2, por modificación en la secuencia de aminoácidos lo que provoca cambios en la estabilidad de la enzima y en el perfil hidrolítico (Blazquez y Morosini, 1995). Se han descrito más de 160 tipos de betalactamasas tipo TEM de las cuales la gran mayoría son BLEE (Jacoby y Muñoz-Price, 2005).

**2.7.2.5.2. BLEE tipo SHV:** Las betalactamasas SHV aparecen principalmente en el género *Klebsiella* aunque también pueden encontrarse en otras enterobacterias. Las betalactamasas del tipo SHV son similares a las TEM en cuanto a su estructura y función. Hasta la fecha existen más de 100 variedades de betalactamasas SHV en bacilos gram-negativos y la mayoría son de espectro extendido (Jacoby y Muñoz-Price, 2005).

Las BLEE tipo SHV derivan de la betalactamasa SHV-1, esto ocurre por medio de sustituciones de aminoácidos en el centro activo de la enzima y agranda el centro activo de la enzima permitiendo de esta manera el acoplamiento de la larga cadena lateral R de las cefalosporinas lo que provoca el aumento del espectro de acción (Tzouveleakis y Bonomo, 1999).

Se han utilizado técnicas moleculares como PCR-SSCP combinadas con PCR-RFLP para la caracterización de las SHV para estudios epidemiológicos (Chanawong *et al* , 2000).

**2.7.2.5.3. BLEE tipo OXA:** Estas betalactamasas pertenecen a la clase molecular D y al grupo 2d y se caracterizan por su alta actividad hidrolítica frente a cloxacilina y oxacilina, son resistentes a ampicilina, cefalotina y son débilmente inhibidas por el ácido clavulánico. Sin embargo la mayoría de estas betalactamasas no hidrolizan a las cefalosporinas de amplio espectro y no son consideradas dentro del grupo de las BLEE, no obstante, OXA-10 hidroliza débilmente cefotaxima, ceftriaxona y aztreonam provocando una reducción de la sensibilidad de muchos microorganismos a estos antibióticos (Bush *et al* , 1995; Patterson y Bonomo, 2005).

**2.7.2.5.4. BLEE tipo CTX-M:** En Alemania, Bauernfeind y cols. (1989) informaron un aislamiento clínico de una cepa de *Escherichia coli* resistente a cefotaxima, la cual es una productora de BLEE que no es TEM ni SHV y fue denominada CTX-M-1 debido a su mayor acción frente a cefotaxima y ceftriaxona que frente a ceftazidima (Bauernfeind *et al* ., 1990).

Estas betalactamasas son más activas frente a cefepime que el resto de las BLEE y el tazobactam presenta mayor actividad inhibitoria frente a las BLEE tipo CTX-M que al ácido clavulánico; sin embargo un mismo microorganismo puede producir BLEE tipo CTX y a la vez SHV o

junto con una betalactamasa tipo AmpC, lo cual implica un cambio en el fenotipo de la resistencia (Paterson y Bonomo, 2005).

Las BLEE del tipo CTX-M que son más próximas a las cefalosporinasas cromosómicas, son infrecuentes en Europa occidental, sin embargo son prevalentes en Sudamérica y se han descrito también en Europa oriental (Muñoz y García Rodríguez, 2003).

Actualmente, las enzimas CTX-M están reemplazando a las TEM y SHV que hasta finales de 1990s eran las BLEE mayormente aisladas; y este porcentaje está aumentando en *E. coli*.

Se conocen más de 65 variantes de betalactamasas CTX-M las cuales se encuentran divididas en 5 subclases en función de la homología en la secuencia de aminoácidos y son: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-25 (Jacoby y Muñoz-Price, 2005).

Se han descrito otras BLEE aisladas con menor frecuencia que pertenecen a diferentes familias como OXA, PER, VEB, BES, GES, SFO, IBC, etc. (Arias, 2011). Estos genes han podido ser identificados y secuenciados por técnicas moleculares como la PCR (Morales ~~et al~~, 2005).

En Latinoamérica se reporta un 45% de gramnegativos productores de BLEE (Puerta, 2005) y en el Perú los pocos estudios realizados reportan *E. coli* y *Klebsiella spp.* productores de BLEE en 3 hospitales

de Lima (Roque *et al.*, 2003; Cuellar *et al.*, 2005). Asimismo, en nuestro país se ha reportado la presencia de BLEE tipo TEM y SHV, asociadas a multirresistencia antibiótica en *E. coli* haciendo un porcentaje de 2,9% (Morales *et al.*, 2005; Cuellar *et al.*, 2005). También se realizó un estudio en Chiclayo donde se detectó la presencia de BLEE gen CTX-M en cepas aisladas de urocultivos (Arce *et al.*, 2014). Sin embargo no hay reporte de CTX-M aisladas de urocultivos en la ciudad de Lima.



### III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

#### HIPÓTESIS

Se han hecho investigaciones cuyos resultados demuestran que los aislados de *E. b* productores de BLEE tipo CTX-M son prevalentes en Sudamérica, por lo que se considera probable que las cepas de *E. b* aisladas de urocultivos procedentes del Hospital Guillermo Almenara Irigoyen presenten una alta frecuencia de resistencia debido a BLEEs que en su mayoría son de tipo *b* CTX-M.

#### OBJETIVOS

##### OBJETIVO GENERAL

Determinar la frecuencia del gen CTX-M que codifica BLEE, presente en cepas de *Eb b* aisladas de urocultivos provenientes del Hospital Guillermo Almenara Irigoyen entre los meses de Marzo a Mayo del 2012.

##### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.-Determinar a nivel fenotípico la producción de BLEE por aislados de *Eb a b* uropatógenos.
- 2.-Determinar la prevalencia del gen CTX-M en los aislamientos antes señalados.

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. MATERIALES

#### 4.1.1. EQUIPOS

- Refrigeradora
- Autoclave
- Congeladora a -20°C
- Incubadora a 37°C
- Microcentrífuga
- Cabina de flujo laminar
- Fuente de poder de 50 a 500 V.
- Cámara de electroforesis horizontal.
- Termociclador *Mastercycler*® personal, marca *Eppendorf*.
- Transiluminador UV

#### 4.1.2. MEDIOS DE CULTIVO

- Caldo Glicerol
- Caldo cerebro- corazón de la marca Merck.
- Agar McConkey de la marca Merck.
- Agar Mueller Hinton de la marca Merck.
- Agar Citrato de Simmons de la marca Merck.
- Agar Triple Sugar Iron (TSI) de la marca Merck.
- Agar Lisin Iron Agar (LIA) de la marca Merck.
- Agar Sulfuro Indol Movil (SIM) de la marca Merck.

#### 4.1.3. REACTIVOS

- Discos de antibióticos de ceftazidima de 30mcg, Valtek. (CAZ)
- Discos de cefotaxima de 30mcg, Valtek. (CTX)
- Discos de amoxicilina/ácido clavulánico (20/10mcg), Valtek. (AMC)
- Discos de ceftazidima/ácido clavulánico (30/10mcg), Valtek. (CTA)
- Discos de cefotaxima/ácido clavulánico (30/10mcg), Valtek. (CTX)
- *Kit* de extracción de plásmidos *PureYield™ Plasmid Miniprep System*, marca Promega.
- Agua de grado molecular.
- Marcador de peso molecular Lambda DNA/HindIII Markers de la marca Promega.
- Buffer de carga Blue/Orange 6X Loading Dye (G190A) de la marca Promega.
- Iniciadores: Invitrogen

Nombre de iniciadores	Secuencia de iniciadores	Referencia
Bla CTX-M (F)	5' TTTGCGATGTGCAGTACCAGTAA3'	Edelstein <i>et al.</i> , 2003
Bla CTX-M (R)	5' CGATATCGTTGGTGGTGCCAT3'	Edelstein <i>et al.</i> , 2003

Tamaño del fragmento amplificado: 544pb

## 4.2. METODOLOGÍA

### 4.2.1. TOMA DE MUESTRA

Cepas de *Escherichia coli* recolectadas en el Hospital Guillermo Almenara Irygoyen aisladas de urocultivos, que sean productores de betalactamasa de espectro extendido durante el periodo marzo del 2012 a mayo del 2012.

#### 4.2.2. TIPO DE ESTUDIO

Este estudio es de tipo descriptivo.

#### 4.2.3. POBLACIÓN MUESTRAL

50 Cepas.

#### 4.2.4. CONSERVACIÓN DE CEPAS

Las cepas se criopreservaron en caldo cerebro corazón (BHI) con glicerol en proporción de 1:1 y se colocaron a una temperatura de 20°C, sacándose solamente para el uso correspondiente.

#### 4.2.5. CONFIRMACIÓN DE LA IDENTIFICACIÓN DE CEPAS

En el laboratorio de Microbiología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM, se procedió a realizar la confirmación fenotípica de cada cepa recolectada para tener la certeza que eran *E. coli* con mecanismo de resistencia bacteriana de betalactamasas de espectro extendido.

Para esto se inoculó 5µL de cada cepa criopreservada a -20°C, en 3mL de caldo tripticasa soya y se incubó a 37°C por 24 horas, luego de este caldo incubado por 24 horas se procedió a sembrar en agar MacConkey por agotamiento y se incubó a 37°C por 24 horas, pasado este tiempo se seleccionó una colonia típica y se inoculó en los siguientes medios diferenciales: Citrato de Simmons, TSI (*Tryptic Soy* *Sugar Iron*), LIA (*Lysine Iron Agar*) y SIM (Sulfuro Indol Móvil Medio); la batería bioquímica se incubó a 37°C por 24 horas.

#### 4.2.6. CONFIRMACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD ANTIBIÓTICA

Se procedió a realizar el respectivo antibiograma a cada cepa que se identificó como *Escherichia coli*. Se usaron placas con agar Mueller Hinton con 4mm de alto; cada cepa se llevó a la turbidez de 0.5 en la escala de Mc Farland y se inoculó en las placas con Agar Mueller Hinton por diseminación en superficie con hisopo. Siguiendo las recomendaciones del CLSI (2010), se colocaron discos de susceptibilidad antimicrobiana (Valtek) de ceftazidima (CAZ de 30µg), ceftazidima/ácido clavulánico (CAZ/CAZ-CLA) de (30µg/10µg), cefotaxima (CTX de 30µg), cefotaxima/ácido clavulánico (CTX/CTX-CLA) de (30µg/10µg), donde una diferencia igual o mayor a 5mm en la diferencia de los halos de inhibición entre los discos de CAZ-CLA y CAZ o CTX-CLA y CTX se interpreta como un resultado positivo; así también al mismo tiempo y en la misma placa se realizó el método de Jarlier (1988) ó el método de la Sociedad Francesa de Microbiología, donde se usan 3 discos de susceptibilidad, amoxicilina/ácido clavulánico (AMC) (20/10mcg), ceftazidima (CAZ) (30mcg) y cefotaxima (CTX) (30mcg) a una distancia de 25mm de centro a centro entre cada disco estando el disco de AMC en el centro entre los discos de CAZ y CTX donde una extensión del borde del halo de inhibición de la cefotaxima hacia el disco de amoxicilina/ácido clavulánico se interpreta como positivo para la producción de BLEE (ver figura N° 4) (Jarlier ~~et al~~ ., 1988; CLSI, 2010). Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas.

#### 4.2.7. EXTRACCIÓN DE PLÁSMIDOS

Para la extracción de plásmidos primero se tomó una alícuota de cada cepa criopreservada a -20°C y se inoculó en 3mL de caldo BHI (Caldo cerebro-corazón) con ampicilina, se incubó a 37°C durante 24 hrs.

Se colocó 1.5mL en un microtubo y se centrifugó a 13000rpm por 2 minutos, se decantó el sobrenadante y se agregó 1mL de agua destilada estéril al sedimento que queda en el fondo y se homogenizó para luego ser centrifugado, este procedimiento se realizó 3 veces o hasta que el sobrenadante quedó transparente, se decantó el sobrenadante y se resuspendió en 500μL de ~~TE~~ TE (10mM trisCl a pH 8.0, 0.1mM EDTA pH 8.0).

Para la extracción de los plásmidos se utilizó el ~~k~~ *P<sub>max</sub>* ~~Yield~~ (TM) *Plasmid Miniprep System* (Promega); se trabajó con el sedimento resuspendido en *buffer* TE, se le agregó 100μL del *buffer* de Lisis Celular (Cell Lysis Buffer - Blue), se homogenizó manualmente invirtiendo el tubo 6 veces, inmediatamente se agregó 350μL de la Solución Neutralizante (que se encuentra a 4°C - 8°C), se homogenizó; luego se centrifugó a 13000rpm durante 5 minutos.

Se transfirió el sobrenadante a una microcolumna, esta se colocó dentro de un tubo de colección (ambos vienen con el kit de extracción), se centrifugó a 13000rpm durante 1minuto; ahora el plásmido se encuentra fijado en la microcolumna, se procedió a los

pasos de lavado para lo cual se le adicionó 200µL de la solución de lavado (*Ethin Removal Wash* - ERB) a la microcolumna, se centrifugó a 13000rpm durante 1 minuto. Luego se le adicionó a la microcolumna 400µL de la solución de lavado de columna (CWC) y se centrifugó a 13000rpm durante 1 minuto; se tiene que tomar en cuenta que la microcolumna no debe tener contacto con las soluciones de lavado después de haber sido centrifugadas.

Luego se transfirió la microcolumna a un microtubo de 1.5 mL, adicionándole 30µL del *buffer* de elución. Se incubó a temperatura ambiente por un minuto, luego se centrifugó a 13000rpm durante 1 minuto para eluir el DNA plasmídico. Luego se conservó a -20°C, hasta el momento de su uso correspondiente.

#### **4.2.8. ELECTROFORESIS PARA COMPROBAR PRESENCIA DE PLÁSMIDOS**

Para la electroforesis se preparó solución TAE a 50X de la siguiente manera: 1) 2.85mL de ácido acético glacial, 2) 1.86 gr de EDTA, 3) 12.1 gr de TRIS base y 4) 50mL de agua destilada, se homogeniza. A partir de esta solución madre (TAE 50X) se preparó una solución TAE a 0.5 X diluyendo 5mL de TAE a 50X en 495mL de agua destilada.

También se preparó gel de agarosa al 1%, para esto se disolvió 0.30 gr en 30mL de solución TAE al 0.5X; se sacaron las muestras producto de la extracción de plásmidos criopreservadas a -20° C y se cargó 5µL en combinación con 1µL de *buffer* de carga, el *buffer* de

carga que se utilizó fue el *Blue/Orange 6X Loading Dye* (G190A), se homogenizó y luego se inoculó en el pocillo correspondiente a cada muestra.

En el primer pocillo se inoculó 1µL del marcador de tamaño molecular Lambda *DNA/HindIII* (Promega) con 1µL de *buffer* de carga y en los pocillos siguientes se inocularon las muestras en orden correlativo.

Se realizó una electroforesis a 70 voltios por aproximadamente 40 minutos.

Finalmente el gel se tiñó con bromuro de etidio y se llevó al transiluminador UV para visualizar los plásmidos y fotografiar.

#### **4.2.9. PREPARACIÓN DE LOS INICIADORES**

Para realizar el PCR, primero se prepararon los iniciadores para luego utilizarlos en el *master mix* del PCR. Los iniciadores se resuspendieron con agua de grado molecular cada uno de acuerdo a la concentración que indicaba en su inserto; para *blaCTX-m-F* (45.0 nmoles) se resuspendió en 450µL de agua de grado molecular (esta es la solución madre), luego se tomó 5µL de solución madre y se le agregó 45µL de agua de grado molecular estéril para que esté a una concentración final de aproximadamente 10mM. Para *blaCTX-m-R* (44.9 nmoles) se resuspendió en 449µL de agua de grado molecular estéril (esta es la solución madre), luego se tomó 5µL de la solución



madre y se le agregó 45µL de agua de grado molecular estéril para que alcance una concentración final de 10mM.

#### 4.2.10. AMPLIFICACIÓN POR PCR DE LOS GENES QUE CODIFICAN $\beta$ -LACTAMASAS

Una vez que se tiene los iniciadores a la concentración requerida, se procedió a preparar el ~~mtm~~ para el PCR. Se trabajó con el kit KOD *Hot Start* (Novagen) y se procedió de la siguiente manera: en un microtubo para PCR se inoculó: 5µL de 10X *Buffer* de KOD *Hot Start* DNA Polymerase, 3µL de MgSO<sub>4</sub> 25mM, 5µL de dNTPs (2mM each), 1µL de KOD *Hot Start* DNA Polymerase (1U/µL), 0.5µL de iniciador *bla* CTX-M (F), 0.5 µL de iniciador *bla* CTX-M (R), 0.5 µL de DNA molde y 34.5 µL de agua de grado molecular estéril completando a un volumen final de 50µL.

El termociclador que se utilizó fue un *MasterCycler*® Personal, marca Eppendorf. Para la amplificación del gen *bla* CTX-m se programó de la siguiente manera: la temperatura de iniciación fue 95°C por 2 minutos, la denaturación se realizó a 95°C por 30 segundos, luego la hibridación se hizo a 58°C por 30 segundos, luego la extensión a 72°C por 30 segundos, después se vuelve al paso número 2 por 34 veces y finalmente a una elongación final de 72°C por 5 minutos, se baja la temperatura a 4°C.

#### **4.2.11. ELECTROFORESIS DE LOS PRODUCTOS DE PCR**

Para determinar si hay presencia de los amplificados, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%, para lo cual en los pocillos se inocularon las muestras en volúmenes en orden creciente dejando siempre el primer pocillo para el marcador de tamaño molecular, el segundo para el control positivo y el último pocillo para el control negativo, se usó un voltaje de 70V por aproximadamente 40 minutos. Luego se procedió a teñir con bromuro de etidio y revelarlo en un transiluminador de UV.

## V. RESULTADOS

Las cepas fueron recolectadas del hospital Guillermo Almenara Irigoyen y luego se conservaron a -20°C.

De las 50 cepas recolectadas, después de la recuperación en caldo Cerebro-Corazón y la inoculación en agar Mac Conkey (Figura N° 1) y tras realizar las pruebas bioquímicas que se mencionan en la metodología: Citrato de Simmons, TSI, LIA, SIM (Figura N° 2), 36 cepas se identificaron como *Escherichia coli*, representando el 72% de la muestra; 3 cepas se perdieron (no se pudieron recuperar en caldo) representando el 6% de la muestra y el 22% se identificaron como *Klebsiella pneumoniae* (11 cepas). Figura N°3.

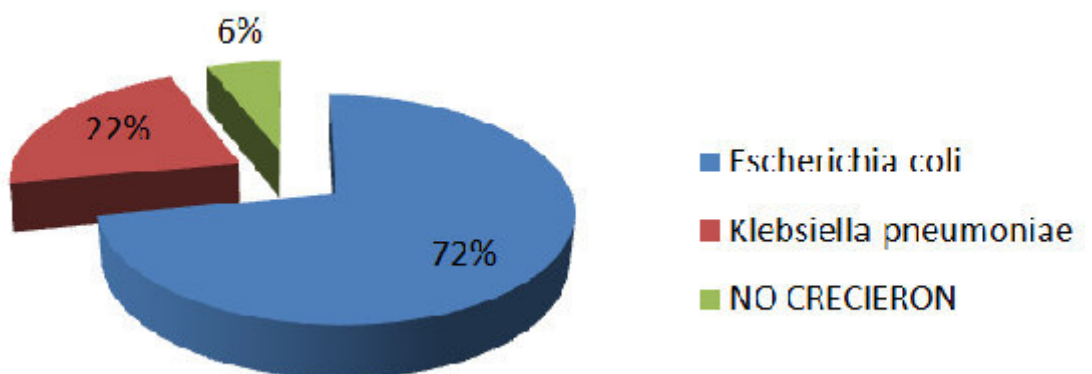


Figura 1. Colonias de *Escherichia coli* en agar MacConkey.



Figura 2. Batería bioquímica para identificación de *Escherichia coli*. De derecha a izquierda: Agar citrato de Simmons, agar TSI, agar LIA y agar SIM. Esta batería bioquímica pertenece a una cepa de *Escherichia coli* indol positivo.

Los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a las 50 cepas para determinar su género y especie se encuentran detalladamente en la Tabla N° 3.



Tamaño de muestra: 50 cepas.

Figura3. Porcentaje de cepas identificadas según su especie de la muestra estudiada.

A cada una de las 36 cepas que se identificaron como *E. coli* se les procedió a realizar un antibiograma, para poder determinar si era productora de BLEE o no (Figura N°4).



Figura 4. Antibiograma para determinar mecanismo de betalactamasa de espectro extendido (CTX=cefotaxima, CAZ=ceftazidima, AMC=amox/ácido clavulánico, CTA=amox/ácido clavulánico/ceftazidima, CTI=amox/ácido clavulánico/cefotaxima). Observamos una diferencia de más de 5mm en los diámetros entre la cefalosporina sola con respecto a la misma cefalosporina combinada con el ácido clavulánico, también observamos en el disco de CTX el halo de inhibición en forma de huevo (Método de Jarlier).

TABLA N°3. Resultados de las pruebas bioquímicas para determinar la especie de cada cepa recolectada.

CEPA	CITRATO	TSI	LIA	SIM	INDOL	ESPECIE
12-001	-	A/A	K/K	MOVIL	+	<i>E. coli</i>
12-002	-	A/A	K/K	MOVIL	+	<i>E. coli</i>
12-003	-	A/A	K/K	MOVIL	+	<i>E. coli</i>
12-004	-	A/A	K/K	MOVIL	+	<i>E. coli</i>
12-005	-	A/A	K/K	MOVIL	+	<i>E. coli</i>
12-006	-	A/A	K/K	MOVIL	+	<i>E. coli</i>
12-007	-	A/A	K/K	MOVIL	+	<i>E. coli</i>
12-008	-	A/A	K/K	MOVIL	+	<i>E. coli</i>
12-009	-	A/A	K/K	MOVIL	+	<i>E. coli</i>
12-010	-	A/A	K/K	MOVIL	+	<i>E. coli</i>
12-011	+	A/A	K/K	NO MOVIL	-	<i>K. pneumoniae</i>
12-012	+	A/A	K/K	NO MOVIL	-	<i>K. pneumoniae</i>
12-013	-	A/A	K/K	MOVIL	+	<i>E. coli</i>
12-014	-	-	-	-	-	NO CRECIO
12-015	-	A/A	K/K	MOVIL	+	<i>E. coli</i>
12-016	+	A/A	K/K	NO MOVIL	-	<i>K. pneumoniae</i>
12-017	-	A/A	K/K	MOVIL	+	<i>E. coli</i>
12-018	-	A/A	K/K	MOVIL	+	<i>E. coli</i>
12-019	-	-	-	-	-	NO CRECIO
12-020	+	A/A	K/K	NO MOVIL	-	<i>K. pneumoniae</i>
12-021	-	A/A	K/K	MOVIL	+	<i>E. coli</i>
12-022	-	A/A	K/K	MOVIL	+	<i>E. coli</i>
12-023	-	A/A	K/K	MOVIL	-	<i>E. coli</i>
12-024	-	A/A	K/K	MOVIL	-	<i>E. coli</i>
12-025	-	A/A	K/K	MOVIL	-	<i>E. coli</i>
12-026	-	A/A	K/K	MOVIL	-	<i>E. coli</i>
12-027	-	A/A	K/K	MOVIL	-	<i>E. coli</i>
12-028	-	A/A	K/K	MOVIL	-	<i>E. coli</i>
12-029	-	A/A	K/K	MOVIL	-	<i>E. coli</i>
12-030	-	A/A	K/K	MOVIL	-	<i>E. coli</i>
12-031	-	A/A	K/K	MOVIL	+	<i>E. coli</i>
12-032	+	A/A	K/K	NO MOVIL	-	<i>K. pneumoniae</i>
12-033	+	A/A	K/K	NO MOVIL	-	<i>K. pneumoniae</i>
12-034	+	A/A	K/K	NO MOVIL	-	<i>K. pneumoniae</i>
12-035	+	A/A	K/K	NO MOVIL	-	<i>K. pneumoniae</i>
12-036	-	A/A	K/K	MOVIL	+	<i>E. coli</i>
12-037	-	-	-	-	-	NO CRECIO
12-038	-	A/A	K/K	MOVIL	+	<i>E. coli</i>
12-039	-	A/A	K/K	MOVIL	+	<i>E. coli</i>
12-040	+	A/A	K/K	NO MOVIL	-	<i>K. pneumoniae</i>
12-041	+	A/A	K/K	NO MOVIL	-	<i>K. pneumoniae</i>
12-042	-	A/A	K/K	MOVIL	+	<i>E. coli</i>
12-043	-	A/A	K/K	MOVIL	+	<i>E. coli</i>
12-044	-	A/A	K/K	MOVIL	+	<i>E. coli</i>
12-045	-	A/A	K/K	MOVIL	+	<i>E. coli</i>
12-046	-	A/A	K/K	MOVIL	+	<i>E. coli</i>
12-047	-	A/A	K/K	MOVIL	+	<i>E. coli</i>
12-048	-	A/A	K/K	MOVIL	+	<i>E. coli</i>
12-049	-	A/A	K/K	MOVIL	+	<i>E. coli</i>
12-050	+	A/A	K/K	NO MOVIL	-	<i>K. pneumoniae</i>

En este cuadro se muestran los resultados de las pruebas bioquímicas de cada una de las cepas recuperadas de criopreservación.

*Escherichia coli* es citrato negativo, en el TSI ácido/ácido, en el LIA alcalino/alcalino, en el SIM es móvil, sin producción de hidrogeno sulfurado e indol positivo.

De las 36 cepas, 21 (58.3%) presentaron mecanismo de resistencia por producción de BLEE, tomando como BLEE positivo a toda aquella cepa cuya diferencia del diámetro del halo de inhibición del crecimiento entre el disco de la cefalosporina sola y el disco combinado de amoxicilina/ácido clavulánico era de 5mm o mayor, según el CLSI (Figura N° 5).

Las medidas de los halos de inhibición de crecimiento, de todas las cepas que se identificaron como *E. b* se encuentran en la Tabla N° 4.

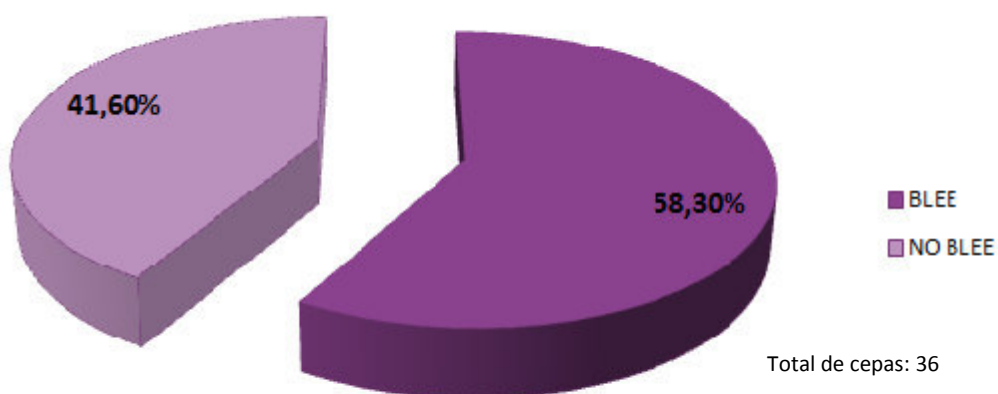


Fig. 5.Cepas *E. coli* BLEE y no BLEE.

**TABLA N° 4.**

Medida de los halos de inhibición de crecimiento en los antibiogramas por disco difusión en placa, según el método del CLSI (2010).

CEPA	CAZ(mm)	CTA(mm)	DIF. DE HALO	CTX(mm)	CTI(mm)	DIF. DE HALO	BLEE
12-001	23	29	<b>6</b>	21	29	<b>8</b>	+
12-002	20	13	<b>-7</b>	14	17	<b>3</b>	-
12-003	16	6	<b>-10</b>	9	13	<b>4</b>	-
12-004	22	15	<b>-5</b>	13	18	<b>5</b>	+
12-005	19	11	<b>-8</b>	11	17	<b>6</b>	+
12-006	22	18	<b>-4</b>	12	15	<b>3</b>	-
12-007	23	19	<b>-4</b>	18	24	<b>6</b>	+
12-008	20	16	<b>-4</b>	11	14	<b>3</b>	-
12-009	20	15	<b>-5</b>	10	8	<b>-2</b>	-
12-010	18	9	<b>-9</b>	12	17	<b>5</b>	+
12-013	18	10	<b>-8</b>	12	18	<b>6</b>	+
12-015	10	13	<b>3</b>	9	14	<b>5</b>	+
12-017	11	6	<b>-5</b>	17	22	<b>5</b>	+
12-018	25	18	<b>-7</b>	12	16	<b>4</b>	-
12-021	28	26	<b>-2</b>	35	37	<b>2</b>	-
12-022	28	22	<b>-6</b>	33	38	<b>5</b>	+
12-023	9	6	<b>-3</b>	6	15	<b>9</b>	+
12-024	8	10	<b>2</b>	9	9	<b>0</b>	-
12-025	9	10	<b>1</b>	10	8	<b>-2</b>	-
12-026	12	6	<b>-6</b>	9	12	<b>3</b>	-
12-027	10	13	<b>13</b>	12	26	<b>14</b>	+
12-028	25	20	<b>-5</b>	30	35	<b>5</b>	+
12-029	21	18	<b>-3</b>	15	21	<b>6</b>	+
12-030	11	6	<b>-5</b>	6	10	<b>4</b>	-
12-051	9	23	<b>14</b>	9	9	<b>0</b>	+
12-036	15	19	<b>4</b>	7	12	<b>5</b>	+
12-038	22	22	<b>0</b>	27	24	<b>-3</b>	-
12-039	11	8	<b>-3</b>	7	12	<b>5</b>	+
12-042	18	36	<b>18</b>	20	32	<b>12</b>	+
12-043	12	14	<b>2</b>	8	13	<b>5</b>	+
12-044	12	24	<b>12</b>	9	9	<b>0</b>	+
12-045	16	20	<b>4</b>	13	33	<b>20</b>	+
12-046	21	25	<b>4</b>	13	27	<b>14</b>	+
12-047	25	28	<b>3</b>	32	32	<b>0</b>	-
12-048	14	21	<b>7</b>	11	13	<b>2</b>	+
12-049	13	40	<b>21</b>	16	33	<b>17</b>	+

En este cuadro se presenta la medida de los halos de inhibición en mm para cada antibiótico utilizado en el antibiograma, CAZ (ceftazidima de 30µg), CTA (ceftazidima/ácido clavulánico de 30µg/10µg), CTX (cefotaxima de 30µg), CTI (cefotaxima/ácido clavulánico de 30µg/10µg), donde una diferencia igual o mayor a 5mm en los halos de inhibición entre los discos de CAZ y CTA o CTX y CTI se interpreta como un resultado positivo.



A estas 21 cepas se les realizó una extracción de plásmidos, un PCR y luego una electroforesis, cuyos resultados se muestran en la Figura N° 6 y N° 8.

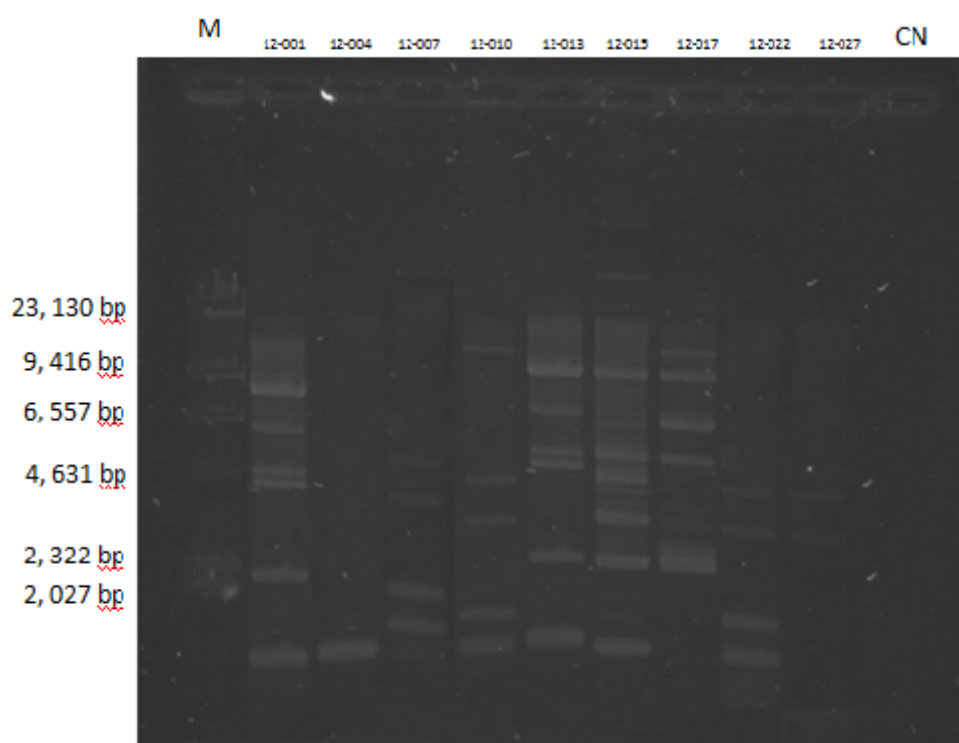


Figura N° 6. Perfil de plásmidos extraídos de las cepas *E. coli* BLEE y separados mediante electroforesis en gel de agarosa. De izquierda a derecha, “M” el marcador de tamaño molecular Lambda DNA/HindIII (Promega), luego las cepas 12-001, 12-004, 12-007, 12-010, 12-013, 12-015, 12-017, 12-022, 12-027 y el control negativo en orden correlativo.

De esas 21 cepas que son *E. coli* y presentan el mecanismo de resistencia por producción de BLEE, el 85.7% (18 cepas) evidenció la presencia del gen de resistencia CTX-M que es uno de los genes que codifica resistencia a betalactamasas de espectro extendido (Figura N°7).

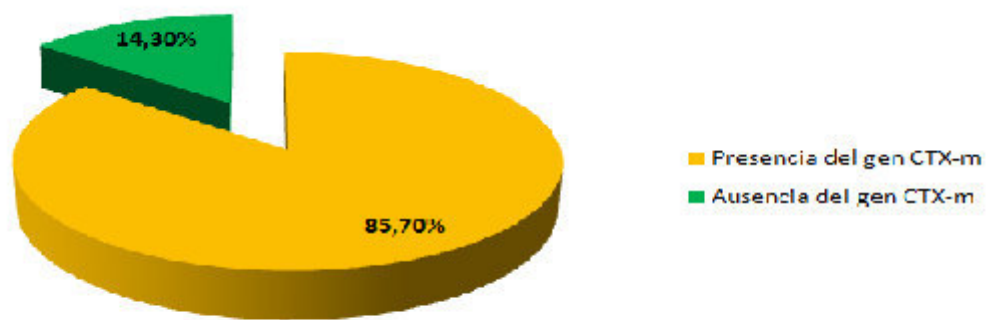


Figura 7. Cepas de *E. coli* con presencia de gen CTX-M.

Los amplificados de CTX-M producto del PCR tienen un tamaño molecular de 544pb (Edelstein *et al.*, 2003).



Figura N° 8. Amplificados de CTX-M producto del PCRde las cepas *E. coli* BLEE y separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. De izquierda a derecha, “M” el marcador de tamaño molecular *Lambda DNA/HindIII* (Promega), luego las cepas 12-001, 12-004, 12-007, 12-010, 12-013 y el control negativo en orden correlativo.

## VI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La prevalencia de cepas de *E. coli* productoras de BLEE no es nada desdeñable debido a un evidente aumento en la ocurrencia de resistencia tipo BLEE como el mecanismo más frecuente de defensa de esta bacteria frente a los antibióticos betalactámicos, corroborado por diversos autores citados anteriormente en este trabajo y estos datos se fortalecen con las publicaciones en las que se manifiesta un aumento en la prevalencia de este tipo de mecanismo de resistencia en urocultivos; de no ser detectada ocasiona una falla terapéutica en el paciente.

La literatura latinoamericana coloca a *E. coli* en primer lugar como agente causal de infecciones del tracto urinario; en caso de las infecciones comunitarias es responsable de más del 80% de los casos en Colombia; reporta también que los aislados de *E. coli* en infecciones del tracto urinario alcanza un 88.3% en pacientes ambulatorios (Leal *et al.*, 2013).

La presencia de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) fue inicialmente descrita en aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* de origen nosocomial, pero en los últimos años se ha comprobado la diseminación de BLEE, particularmente del tipo CTX-M en cepas de *E. coli* causantes de infecciones en la comunidad (Leal *et al.*, 2013).

En el 2007 en Irán, se realizó un trabajo donde se aislaron 164 cepas provenientes de urocultivos donde 124 cepas eran *E. coli* y 40 cepas *K. pneumoniae*, 21 de 40 cepas de *K. pneumoniae* fueron BLEE y 56 de 124 *E. coli* fueron BLEE (Aminzadeh *et al.*, 2008).

En Uruguay el agente etiológico de ITU más frecuente fue *E. coli* con un 80% de prevalencia (Seija *et al*, 2010).

Investigaciones en España, reportan una incidencia del 2.4% de *E. coli* con BLEE en infecciones para el año 2000 y esta cifra se incrementó a un 4.04% de *E. coli* con BLEE para el año 2006; en un estudio local realizado en Sevilla, Rodríguez Baño *et al* confirma que la prevalencia de cepas resistentes está adquiriendo mayor importancia en el medio extrahospitalario (Rodríguez Baño *et al*, 2004).

En este sentido, Ena *et al* estudiaron durante 1999-2004 la evolución de las infecciones urinarias causada por *E. coli* con BLEE comparándolas con las causadas por *E. coli* sin BLEE, esos autores encontraron un incremento de *E. coli* con BLEE del 0.20 al 5.52% de los aislamientos por año, de ellas, el 62% era de adquisición en la comunidad y el 38% de origen nosocomial, con una alta tasa de resistencias a la mayoría de los antibióticos, excepto carbapenem y fosfomicina (Ena *et al*, 2006).

En un estudio realizado en Argentina el año 2005, se reportó que el 26.3% eran cepas de *E. coli* BLEE aisladas de orina (Muzachiodi y Ferrero, 2005). En este trabajo los resultados demuestran que el 58.3% (22 cepas) de cepas de *E. coli* fueron productoras de BLEE, estos datos corroboran las estadísticas de otros lugares y nos dan un alcance de lo que está sucediendo en nuestro medio.

Como se puede observar, actualmente se está produciendo un cambio epidemiológico en cuanto a los tipos de BLEE más prevalentes y su distribución, con mayor presencia en *E. coli* procedente del medio extrahospitalario (principalmente en aislamientos de muestras urinarias) y en relación con BLEE del tipo CTX-M.

Entre 1986 y 1992 aparecieron, casi simultáneamente, las primeras CTX-M en Japón, Alemania, Argentina, Italia y Francia.

Hasta finales de los años noventa la mayoría de las BLEE, principalmente el tipo *bla* TEM y *bla* SHV, correspondían a cepas de *K. pneumoniae* implicadas en brotes nosocomiales, sobretodo en unidades de cuidados intensivos. Actualmente la atención se centra en el cambio epidemiológico que se está produciendo en cuanto a los tipos de BLEE más prevalentes y su distribución, con mayor presencia en *E. coli* procedente del medio extrahospitalario (principalmente en el aislamiento de muestras urinarias) y en relación con BLEE del tipo CTX-M. El grupo CTX-M ha adquirido una gran relevancia epidemiológica debido a su dispersión intra y extra-hospitalaria. Actualmente se detectan, sobre todo en *Escherichia coli* y en pacientes con infecciones contraídas en la comunidad, produciéndose un flujo de aislados desde este ambiente al medio hospitalario. Su éxito epidemiológico se debe a la presencia de genes que codifican éstas enzimas en elementos móviles como los plásmidos o transposones y su asociación a integrones, más que a su diseminación clonal, como *bla*SHV y *bla*TEM (Arce *et al.*, 2014, Leal *et al.*, 2013, Seral *et al.*, 2010).

Calbo *et al.*, en un estudio realizado en Barcelona encontraron que de las cepas de *Escherichia coli* BLEE aisladas de urocultivos, el 60% eran tipo *bla*TEM, el 16% de tipo *bla*SHV y el 24% de tipo *bla*CTX-M. Sin embargo, Rodríguez Baños *et al.*, en Sevilla, detectaron que el tipo más frecuente era el grupo *bla*CTX-M-9 con un 64%, seguido de *bla*SHV con el 18% y *bla*TEM con el 18% (Calbo *et al.*, 2006; Rodríguez Baños *et al.*, 2004).

Como se observa, la prevalencia de BLEE de tipo *b* CTX-M en España no es nada despreciable y esta prevalencia es más marcada en un estudio posterior, donde 112 cepas productoras de BLEE aisladas en pacientes con infecciones adquiridas en la comunidad (95% urinarias), el 69% eran del grupo *b* CTX-M (con un predominio de las blaCTX-M-9, seguidas de la blaCTX-M-14), un 32% eran del grupo *b* SHV y solo el 6% eran del grupo blaTEM (Díaz *et al.*, 2009).

En un trabajo realizado en Colombia, el 3.1% (9 cepas) de las cepas aisladas como *Escherichia coli* se confirmaron fenotípicamente como BLEE y de estas 6 cepas se determinaron como blaCTX-M-15 y las otras 3 cepas se determinaron como blaSHV (Leal *et al.*, 2013).

En el Perú, en un estudio realizado en niños de comunidades rurales de la selva peruana que no se exponen a antimicrobianos, se determinó que las *E. coli* comensales de heces presentaban una tasa de resistencia a ceftriaxona de 0.1% y de 1.7%. Asimismo se determinó la presencia de BLEE tipo CTX-M del grupo 9 (CTX-M-14 y CTX-M-15) (Arce *et al.*, 2014).

En Lima, el año 2000 se realizó un trabajo en el que participaron los hospitales Guillermo Almenara Irigoyen y Edgardo Rebagliati Martins, en el que se trabajaron con 137 cepas de *E. coli* de las cuales 4 cepas fueron determinadas como BLEE, de estas una cepa se calificó como TEM y 3 cepas como SHV, cabe mencionar que en este trabajo no determinan el origen de las cepas recolectadas; no se realizó la PCR para determinar CTX-M (Morales *et al.*, 2005).

En el año 2012, en la región de Chiclayo se detectó la presencia de genes tipo *bla* TEM y *bla* SHV en 66 cepas de *Escherichia coli* aisladas de infecciones urinarias de las cuales 18 no expresaban ninguno de los genes en estudio (TEM y SHV), el gen más frecuente fue TEM con un 60.6% de prevalencia (Arce *et al.*, 2012).

El 2013 en el Perú, en Chiclayo se realizó un trabajo con 50 cepas de *Escherichia coli* BLEE provenientes de urocultivos, donde 8 cepas presentaban el gen *bla*TEM, 22 cepas presentaban el gen *bla*SHV y solo 10 cepas presentaban el gen *bla*CTX-M y 10 cepas no presentaron ninguno de los 3 genes (Arce *et al.*, 2014).

El presente estudio se realizó con cepas que se habían aislado de urocultivos y se habían determinado como BLEE en el periodo señalado anteriormente; de acuerdo a los resultados obtenidos el 72% las cepas de la muestra se determinó como *Escherichia coli* y de éstas el 58.3% (21 cepas) se determinaron como BLEE, corroborando los datos estadísticos de otros trabajos realizados en diferentes países, donde la cantidad de cepas determinadas como *E. coli* BLEE no son nada desdeñables, por el contrario son datos que dan la alarma de nuestra realidad. Asimismo, de este 58.3% de cepas *Escherichia coli* BLEE, 18 presentaron el gen de resistencia *bla*CTX-M representando el 85.7%.

Teniendo en cuenta los datos del trabajo realizado en Chiclayo el 2013 donde las BLEE CTX-M representan el 20%, podemos ver que hay diferencia significativa de la prevalencia de CTX-M con respecto a nuestros resultados que son de Lima.

Las BLEE más frecuentes en la actualidad son TEM-4, TEM-24, TEM-52, SHV-12, CTX-M-9, CTX-M-14, CTX-M-3, CTX-M-15 y CTX-M-32 (Seral *et al.*, 2010).



Como se puede apreciar la presencia de cepas CTX-M es alto y los resultados aquí presentados coinciden con los cambios epidemiológicos que se han dado en los últimos años en todo el mundo.

Cabe mencionar que las limitaciones de este estudio se presentan por el hecho de tener como referencia sólo un hospital y por no contar con los datos ni las historias clínicas de los pacientes por lo que no se realizó un estudio de tipo epidemiológico.

La OMS (2001) recomienda hacer estudios para conocer los mecanismos moleculares de resistencia a antimicrobianos. En este sentido, la tesis realizada es importante ya que aporta datos valiosos a las estadísticas de nuestro país, datos estadísticos que deben tomarse en cuenta de manera seria para evitar, en cuanto sea posible, el aumento de la resistencia bacteriana a antibióticos.

Los estudios y caracterización a nivel molecular de la resistencia antimicrobiana en nuestro país son muy pocos, la investigación realizada por lo tanto aporta al conocimiento en este aspecto, aun así se necesita más investigación al respecto de manera permanente para vigilar cómo progresa en el transcurso del tiempo la resistencia a antibióticos por BLEE y precisar el tipo de genes BLEE presentes en nuestro país su frecuencia y prevalencia para contribuir al desarrollo de un programa que intente controlar la diseminación de estos genes.

## VII. CONCLUSIONES

1. El principal agente etiológico en urocultivos del Hospital Guillermo Almenara Irigoyen, entre marzo y mayo del 2012 fue *E. coli* productora de BLEE.
2. El mecanismo de resistencia por BLEE en *E. coli* de urocultivos fue de 58.3% del total de la muestra.
3. El gen *bla<sub>CTX-M</sub>* que codifica BLEE es altamente prevalente (85.7%) y es portado en plásmidos en *E. coli* aisladas de urocultivos.

## VIII. RECOMENDACIONES

1. La primera medida para controlar la diseminación de *E. b* con BLEE es pensar en su existencia y educar a los sanitarios y a todo el personal de salud en cuanto a la necesidad de racionalizar el uso de cefalosporinas, especialmente de tercera generación, y de fluoroquinolonas.
2. En cada área de salud, el laboratorio de referencia, los hospitales asociados, todos los centros de atención, deberían trabajar conjuntamente para definir la epidemiología de las cepas resistentes en la zona, lo que permitiría adoptar medidas de prevención concretas.
3. Se debe realizar una constante vigilancia de los cambios epidemiológicos de los agentes etiológicos de las bacteriemias.
4. Se debería suplir la necesidad de adoptar en todas las infecciones no solo las urinarias un enfoque terapéutico que siga las bases clínicas, microbiológicas y farmacológicas del uso racional de los antibióticos.

## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ABBOTT, S., O'CONNOR, J., ROBIN, T., ZIMMER, B., JANDA, J. Biochemical properties of a newly described *Eb* species, *Eb ab*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003, Vol. 41, N° 10, p. 4852-4854.

AL-JASSER, Asma. Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs): A Global Problem. *Kuwait Medical Journal*. 2006, Vol. 38, N° 3, p. 171-185.

ALVAREZ BARRANCO, Luis Carlos. Infecciones de las vías urinarias en el Hospital Universidad del Norte. *Revista de Salud Uninorte, Barranquilla (Colombia)*. 2007, Vol. 23, N°1, p. 9-18.

AMBLER, R. Th estructure of  $\beta$ -lactamases. *Philosophical transactions of the Royal Society of London*. 1980, Vol. 289, N° 1036, p. 321-331.

AMINZADEH, Zohreh; SADAT KASHI, Mohtaram; SHA'BANI, Minoosh. Bacteriuria by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates in a Governmental Hospital in south of Tehran, Iran. *Iranian Journal of Kidney Diseases*. 2008, Vol. 2, N° 4, p. 197-200.

ANDRADE, SS; SADER, HS; JONES, RN *et al*. Necesidad de Guías de Tratamiento Locales para Infecciones Urinarias Adquiridas en la Comunidad. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2006, Vol. 101, N° 7, p. 741-748.

ANDRÉU, Antonia; CACHO, Juana; COIRA, Amparo y LEPE, José Antonio. Diagnóstico microbiológico de las Infecciones del tracto urinario. *Revista de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2011, Vol. 29, N° 1, p. 52 – 57.

ANTÓN, Manuel; ESTEBAN, Raquel y ORTÉS, Raquel. Infección Urinaria. Sociedad Española de Geriátría y Gerontología (SEGG) (Edit.). *Tratado de Geriátría para Residentes*. Madrid. 2006, cap. 42, p. 429 – 433.

ARCE, Zhandra; ALARCÓN, Edwin; LIMO, J.; LLONTOP, José; VALLE, J. Detección de genes SHV y TEM en cepas de *Escherichia coli* productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido procedentes de dos centros hospitalarios de Chiclayo-Perú: Enero – Agosto 2011. *Revista del cuerpo médico*. Perú. HNAAA. 2012, Vol. 5, N° 3, p. 13-6.

ARCE GIL, Zhandra; LLONTOP NUÑEZ, José; ALARCÓN BENAVIDES, Edwin; LÓPEZ LÓPEZ, Elmer. Detección de los genes SHV, TEM y CTX-M en cepas de *Escherichia coli*  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido procedentes de un Hospital de Chiclayo – Perú. *Revista del cuerpo médico*. Perú. HNAAA. 2014, Vol. 7, N° 3, p. 27-30.

ARIAS, Gerson. “Características clínicas y frecuencia de betalactamasas de espectro extendido en aislamientos de enterobacterias causantes de IVU de origen comunitario en pacientes adultos de siete hospitales pertenecientes a las red GREBO 2009-2010. Universidad Nacional de Colombia. Asesor: Jorge Alberto Cortés. Tesis de maestría. 2011.

BARCELONA, Laura; MARIN, Marcelo y STAMBOULIAN, Daniel. Betalactámicos con Inhibidores de Betalactamasas Amoxicilina-Sulbactam. *Fundación Revista Medicina (Buenos Aires)*. 2008, Vol. 68, N° 1, p. 65 – 74.

BARRERA, Boris; CANALES, Ana; MARTINEZ, Pabla *et al.* Incidencia de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido en el Hospital Clínico de de la Universidad de Chile. *Revista Hospital Clínico*. 2005, Vol. 16, N° 2, p. 101 – 106.

BAUERNFEIND, A.; GRIMM, H.; SCHWEIGHART, S. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection Journal*. 1990, Vol. 18, N° 5, p. 294-8.

BLANCO, J.; BLANCO, M.; BLANCO, J.; MORA, A.; ALONSO, M.; GONZALEZ, E.; BERNARDEZ, M. Enterobacterias: Características generales. Género *Escherichia* In: *Manual de Microbiología Veterinaria*, Vadillo S, Piriz S, Mateos E, Eds., McGraw-Hill Interamericana España 2002, 301-325.

BLASCO LOUREIRO, L; SOUTO MOURE, C; MARCHENA FERNANDEZ, M. A. Infecciones del tracto urinario. Pautas de tratamiento empírico de la infección no complicada según los datos de sensibilidad antimicrobiana de un área de salud. *Farmacia de atención primaria*. 2006, Vol. 4, N° 1, p. 20-21.

BLAZQUEZ, J. and MOROSINI, M. Single amino acid replacements at positions altered in naturally occurring extended-spectrum TEM betalactamasas. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 1995, Vol. 39, N° 1, p. 145-9.

BUSH, K; JACOBY, G; MEDEIROS, A. A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 1995, Vol.39,Nº6, p. 1211-1233.

CALBO, E.; ROMANI, V.; XERCAVINS, M.; GÓMEZ, L.; VIDAL, CG.; QUINTANA, S. *et al.* Risk factors for community-onset urinary tract infections due *Escherichia coli* harbouring extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2006, Vol. 57, p. 780-3.

CARO, María; HERNANDO, Susana; CARRERO, Pablo *et al.* Estudio de multirresistencia antibiótica de *Escherichia coli* en urocultivos. *Revista Medicina Clínica*. 2007, Vol. 129, Nº 11, p. 409-411.

CASTAÑEDA-DIAZ, Milagros, REQUELME-PORTOCARRERO, Frank, POMA-ORTIZ, Jaquelyn. Infecciones intrahospitalarias: un círculo vicioso. *Revista Médica Herediana*. 2011, Vol. 22, Nº 4, p. 202-203. ISSN 1018-130X.

CASTRO, Natividad; CARREON, Etzel; MORENO, María *et al.* Caracterización Molecular de  $\beta$ -lactamasas de Espectro Extendido en Aislamientos Clínicos de *Escherichia coli*. *Revista de Enfermedades Infecciosas y Microbiología*. 2008, Vol. 28, Nº 3, p. 114-120.

CAVALIERI, Stephen *et al.* *Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana*. Editora Coordinadora: Marie B. Coyle. Sociedad Americana de Microbiología. 2010, cap. 2, p. 15 – 21. ISBN 1-55581-347.

CAVAGNARO, Felipe. Infección urinaria en la infancia. *Revista de infectología de Chile*. Santiago, Junio. 2005, Vol. 22, N°2, p. 161-168.

CHAIBI, E. and FARZANEH, S. Problems encountered in the characterization of IRT beta-lactamase-producing clinical *Escherichia coli* isolates intermediate-resistant to cephalothin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1996, Vol. 37, N° 1, p. 190-1.

CHANAWONG, A., M'ZALI, F., HERITAGE, J., LULITANOND, A., HAWKEY, P. Characterisation of extended-spectrum beta-lactamases of the SHV family using a combination of PCR-single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP) and PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). *FEMS Microbiology Letters*. 2000, Vol. 184, N° 1, p. 85-9.

CHIARELLA, Pascual, FUKUDA, Juan, CHAPARRO, Eduardo, YI, Augusto. Infección del tracto urinario en pediatría: Etiología y tratamiento. *Revista Médica Herediana*. 1993. Vol. 4, N° 4.

CLEMENTE, M.; GARCÍA, E.; DE BURGOS, J. *et al.* Infecciones Urinarias Actitud de Urgencias en Atención Primaria. *Revista Semergen*. 1998, vol. 24, n° 6, p. 474-475. ISSN: 1138-3593.

CLSI. *Performance Standards of Antimicrobial Susceptibility Testing*, Twentieth Informational Supplement. M100-S20. USA. 2010. Vol. 30, N° 1.

COLL, Pere; COQUE, M. Teresa; DOMINGUEZ, M. Ángeles; VAZQUEZ, Julio; VILA, Jordi. Procedimientos en Microbiología Clínica. Métodos moleculares de tipificación



epidemiológica en bacteriología. *Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2005. SEIMC, Documentos científicos, Segunda edición. ISBN: 84-609-7030-2.

CUÉLLAR, Luis; VICENTE, William y SILVA, María. “Cepas de *E. coli* y *Klebsiella spp.* productoras de betalactamasas de espectro extendido en aislamientos clínicos de infecciones intrahospitalarias en un hospital oncológico, en Perú.” En: *XII Congreso de la Asociación Panamericana de Infectología. VI Congreso Venezolano de Infectología. II Simposio Latinoamericano y del Caribe de Infecciones de Transmisión Sexual*. Caracas, Venezuela, 15-18 Mayo 2005.

DALET, Fernando; DEL RIO, Gerardo. Infecciones Urinarias. 2007, Julio, primera edición. Primera reimpresión, mayo, 1998. Pág. 15.

DE CASTAÑO, Iris; GONZÁLEZ, Claudia; BUITRAGO, Zaidy *et al.* Etiología y sensibilidad bacteriana en infección urinaria en niños. Hospital Infantil Club Noel y Hospital Universitario del Valle, Cali, Colombia. *Revista Colombia Médica*. 2007, Vol. 38, N° 2, p. 100-106. ISSN: 1657-9534.

ANGEL DIAZ, M.; RAMÓN HERNÁNDEZ, J.; MARTÍNEZ MARTÍNEZ, L.; RODRÍGUEZ BAÑO, J.; PASCUAL, A. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Spanish hospitals: 2nd multicenter study (GEIH-BLEE Project, 2006). *Revista de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2009, Vol. 27, N° 1, p. 503-10.

ECHEVARRIA-ZARATE, Juan; SARMIENTO, Elsa; OSORES-PLERGE, Fernando. Infección del tracto urinario y manejo de antibiótico. *Acta Médica Peruana*. 2006, Vol. 23, N° 1, p. 26-31.

EDELSTEIN M., PIMKIN M., PALAGIN I., EDELSTEIN I. y STRATCHOUNSKI. Prevalence and Molecular Epidemiology of CTX-M Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian Hospitals. *Journals Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2003, Vol. 47, N° 12, p. 3724-3732.

EMÖDY, L.; KERENYI, M.; NAGY, G. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli*. *International Journal Antimicrobial Agents*. 2003, Vol. 22, N°2, p. 29 – 33.

ENA, J.; ARJONA, F.; MARTÍNEZ-PEINADO, C.; LÓPEZ PÉREZAGUA, M.; AMADOR, C. Epidemiology of urinary tract infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. *Urology*. 2006, Vol. 68, p. 1169-74.

GARCIA-HERNANDEZ, Ana María; GARCIA-VASQUEZ, Elisa; HERNANDEZ-TORRES, Alicia; RUIZ, Joaquín; YAGÜE, Genoveva; HERRERO, José Antonio; GOMEZ, Joaquín. Bacteremias por *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido (BLEE): significación clínica y perspectivas actuales. *Revista Española de Quimioterapia*. 2011, Vol. 24, N° 2, p. 57- 66.

GOMEZ, J.; MUÑOZ, R.; BAÑOS, V. y GÓMEZ, G. Tratamiento de las infecciones urinarias adquiridas en la comunidad: perspectivas actuales y enfoque clínico del paciente. *Revista Española de Quimioterapia*. 2005, Vol. 18, N° 4, p. 319-327.

GOUSSARD, Sylvie y COURVALIN, Patrice. Updated Sequence Information for TEM b-Lactamase Genes. *Journals Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1999, Vol. 43, N° 2, p.367-370.

GUPTA, V. An update on newer beta-lactamases. *Indian Journal Medical Research*. 2007, Vol. 126, N° 5, p. 417-427.

HERNÁNDEZ, José; PASCUAL, Álvaro; CANTÓN, Rafael y *et al.* *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productores de betalactamasas de espectro extendido en hospitales españoles (Proyecto GEIH-BLEE 2000). *Revista de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2003, Vol. 21, N° 2, p. 77-82.

HIDALGO, Luis Francisco, MARROQUI, Jorge Enrique, ANTIGONI, Juana, SAMALVIDES, Frine. Prevalencia de las infecciones hospitalarias en un hospital peruano de nivel IV, en el 2008. *Revista de medicina Herediana*. 2011, Vol. 22, N°2, p. 76-81.

HORCAJADA, Juan y FARIÑAS, María del Carmen. Implicaciones de las resistencias bacterianas en las infecciones urinarias adquiridas en la comunidad. *Revista de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2005, Vol. 23, N°1, p. 1 – 3.

JACOBY, G. and MUÑOZ-PRICE, L. The new beta-lactamases. *N Engl J Med*. 2005, Vol. 352, N° 4, p. 380-391.

JARLIER,V., NICOLAS,M., FOURNIER,G.,PHILIPPON,A. Extended broad-spectrum betalactamasas conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in

Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Reviews of Infectious Diseases*. 1988, Vol. 10, N° 4, p. 867-878.

JAPONI, A.; GUDARZI, M.; FARSHAD, S.; BASIRI, R.; ZIYAEYAN, M.; ALBORZI, A.; RAFAATPOUR, N. Assay for Integrins and Pattern of Antibiotic Resistance in clinical *Escherichia coli* strains by PCR-RFLP in Southern Iran. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 2008, Vol. 61, p. 85 – 88.

JIMENEZ JIMENEZ, Juan Guillermo; BALPARDA ARIAS, Jon Kepa; CASTRILLON VELILLA, Diana Marcela; DÍAZ MONTES, Silvia Yolima; ECHEVERRI GOMEZ, Juliana Andrea; ESTRADA RESTREPO, Catalaina, *et al.* Caracterización epidemiológica de las infecciones nosocomiales en un hospital de tercer nivel de atención de la ciudad de Medellín, Colombia: Enero 2005 – Julio 2009. *Revista de Medicina U.P.B.* 2010, Vol.29, N°1, p. 46-55.

JOHNSON, J. Evolution of pathogenic *Escherichia coli*. In: *Escherichia coli: Virulence mechanisms of a versatile pathogen*. Donnenberg MS, Ed. Elsevier Science Inc. USA 2002, p. 55-77.

JOHNSON, J. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clinical Microbiology Reviews*. 1991, Vol. 4, N° 1, p. 80-128.

KADDER, Abdulrahman y KUMAR, Angamuthu. Prevalence and antimicrobial susceptibility of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a general hospital. *Annals of Saudi Medicine*. 2005, Vol. 25, N° 3, p. 239 – 242.

KONEMAN, Elmer; WINN, Washington; ALLEN, Stephen; JANDA, William; PROCOP, Gary; SCHRECKENBERGER, Paul y WOODS, Gail. Diagnóstico microbiológico. Texto y atlas en color. 6ta Edición. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana. 2006. 1696p. ISBN: 978-950-06-0895-4.

LEAL Ana Lucía, CORTÉS Jorge Alberto, ARIAS Gerson, OVALLE María Victoria, SAAVEDRA Sandra Yamile, BUITRAGO Giancarlo, ESCOBAR Javier Antonio, CASTRO Betsy Esperanza y GREBO. Emergencia de fenotipos resistentes a cefalosporinas de tercera generación en *E. coli* causantes de infección del tracto urinario de inicio comunitario en hospitales de Colombia. *Revista de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2013, Vol. 31, N° 5, p. 298-303.

LEONÉS, E; BANDERAS, M.; JIMÉNEZ, A. *et al.* Etiología y resistencias bacterianas de las infecciones urinarias en un centro de salud rural. *Revista Medicina de Familia (And)*. 2002, Vol. 3, N° 2, p. 104 – 107.

LEVISON, M. Plasmid-mediated Extended-spectrum beta-Lactamases in organisms other than *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*: A Hidden Reservoir of Transferable Resistance Genes. *Current Infectious Disease Reports*. 2002, Vol. 4, N° 3, p. 181-183.

LIVERMORE, D. BetaLactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical Microbiology Reviews*. 1995, Vol. 8, N° 4, p. 557-584.

MARTINEZ ORTIZ DE ZARATE, M.; Aspectos epidemiológicos de las infecciones en las Áreas de urgencias. *Revista Emergencias*. 2001; 13:544-550.

MIYAHIRA, Juan. Infección urinaria intrahospitalaria en los servicios de hospitalización de Medicina de un hospital general. *Revista Médica Herediana*. 1994. Vol. 5, N° 2, Abril-Junio.

MORALES, José-Luis; REYES, Karina; MONTEGHIRFO, Mario *et al.* Presencia de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido en dos hospitales de Lima, Perú. *Anales de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos*. 2005, Vol. 66, N° 1, p. 24 – 32.

MUÑOZ, Juan Luis y GARCIA-RODRIGUEZ, José Ángel. Detección de mecanismos de resistencia. *Revista de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2003, Vol. 21, N°2, p. 72-74.

MUZACHIODI, Marisol y FERRERO, Susana. Incidencia de enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas*. Universidad Nacional del Nordeste, Argentina. 2005.

NELSON, E and ELISHA, B. Molecular basis of AmpC hyperproduction in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 1999, Vol. 43, N° 4, p. 957-9.

OCHOA SANGRADOR, C.; EIROS BOUZA, J. M.; PÉREZ MENDEZ, C; INGLADA GALIANA, L. Y Grupo de Estudio de los Tratamientos Antibióticos. Etiología de las infecciones del tracto urinario y sensibilidad de los uropatógenos a los antimicrobianos. *Revista Española de Quimioterapia*. 2005, Vol. 18, N°2, p. 124-135.

PAPANICOLAOU, G., MEDEIROS, A., JACOBY, G. Novel plasmid-mediated betalactamase (MIR-1) conferring resistance to oxymino- and alpha-methoxy beta-lactams in clinical of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 1990, Vol. 34, N° 11, p. 2200-9.

PASTOR, Raimundo. Infección del tracto urinario. *El Farmacéutico*. 2007, Vol. Enero, p. 72 – 82. ISSN:02137283.

PATTERSON, D. and BONOMO, R. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clinical Microbiology Review*. 2005, Vol. 18, N° 4, p. 657-86.

PATTERSON, J. Extended-spectrum beta-lactamases. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine. Journal*. 2003, Vol. 24, N° 1, p. 79-88.

PIGRAU, C.; HORCAJADA, J.; CARTÓN, J.; PUJOL, M.; MENSA, J. Infección urinaria. Protocolos Clínicos SEIMC. 2002. [www.seimc.org/protocolos/clínicos/proto4.htm](http://www.seimc.org/protocolos/clínicos/proto4.htm)

PINO, Carolina; DOMINGUEZ, Mariana; González, Gerardo y *et al*. Producción de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en cepas de *Acinetobacter baumannii* aisladas en hospitales de la VIIIa Región, Chile. *Revista Chilena de Infectología*. 2007, Vol. 24, N° 2, p.137-141.

PLANELL, Andreu. Etiología y Sensibilidad a Antimicrobianos de las Infecciones urinarias Bajas Adquiridas en la Comunidad. Estudio nacional multicéntrico. *Revista de Medicina Clínica*. Barcelona. 2008, Vol. 130, p. 481 – 486.

POIREL, L., HERITIER, C., TOLUM, V., NORDMAN, P. Emergence of oxacilinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumonia*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 2004, Vol. 48, N° 1, p. 15-22.

PUERTA, Henry; CANTILLO, César; CONSUEGRA, Claudia *et al.* Capacidad de los laboratorios de microbiología clínica de Cartagena para detectar microorganismos productores de betalactamasas de espectro extendido. *Revista Infectio*. 2005, Vol. 9, N° 3, p. 123 – 130.

RAMOS, María; BÚ, Efraín; RIVERA, Gina y *et al.* Agentes causales de infecciones urinarias y su sensibilidad antimicrobiana en pacientes atendidos en el Departamento de Medicina Interna. *Revista Médica de los Post Grados de Medicina*. 2006, Vol. 9, N° 3, p.334-338.

RIVERA-JACINTO, Marco; RODRIGUEZ, Claudia y HUAYAN, Gladys. *Pseudomonas aeruginosa* productora de betalactamasa clásica y de espectro extendido en reservorios de un servicio de neonatología. *Revista Peruana de Medicina Experimental en Salud Pública*. 2008, Vol. 25, N° 2, p. 250 – 252.

RODRIGUEZ, J.; NAVARRO, M.; ROMERO, L. *et al.* Epidemiología Clínica y Molecular de la *Escherichia coli* Productora de Beta-Lactamasas de Espectro Extendido como Causa de Infecciones Nosocomiales o Colonización: Repercusiones para el Control. *Review Clinical Infectious Diseases*. 2006, Vol. 42, N° 1, p. 37 – 45.

RODRÍGUEZ BAÑOS, J.; NAVARRO, MD.; ROMERO, L.; MARTÍNEZ MARTÍNEZ, L.; MUNIAIN, MA.; PEREA, EJ.; PASCUAL, A. Epidemiology end clinical features of



infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *E. coli* in non hospitalized patients. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004, Vol. 42, p. 1089-94.

RONDON NUCETE, Miguel; RONDON DE GARCIA, Ana Verónica; ORENCE LEONETT, Onelia. Infección del tracto urinario. Primera edición digital. Universidad de los Andes. Venezuela. 2011, p. 19.

ROQUE, M.; REYES, K.; MORALES, J. *et al.* Detección e identificación de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido en *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* de dos hospitales de IV nivel de Lima. II Congreso Científico Internacional del Instituto Nacional de Salud. Lima, 15-19 Julio 2003. *Revista Peruana de Medicina Experimental en Salud Pública*. 2003, Vol. 20, N° 3, p. 8.

SÁNCHEZ ARTOLA, Beatriz. Betalactamasas de espectro extendido (BLEE). *Revista Electrónica de Medicina Intensiva*. 2004, Vol. 4, N° 8, artículo N°C6.

SANDERS, C. and SANDERS, W. JR. Betalactam resistance in gram-negative bacteria: global trends and clinical impact. *Clinical Infectious Diseases*. 1992, Vol. 15, N° 5, p. 24-39.

SATURA, José Antonio. Infección del Tracto Urinario en Niños. Guía Práctica de Medicina Basada por Evidencia para el diagnóstico y Tratamiento. *Revista Honduras Pediátrica*. 2004, Vol. 24, N° 2.

SEIJA, V.; FRANTCHEZ, V.; PINTOS, M. Etiología de la infección urinaria de adquisición comunitaria y perfil de susceptibilidad de *E. coli* a los principales agentes antimicrobianos. *Revista Médica de Uruguay*. 2010, vol. 26, n° 1, p. 14-24.

SERIAL GARCÍA, Cristina; PARDOS DE LA GÁNDARA, María y CASTILLO GARCÍA, Francisco Javier. Betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias distintas de *Escherichia coli* y *Klebsiella*. *Revista de Enfermedades Infecciosas y Microbiología*. 2010, Vol. 28, N° 1, p. 12-18.

SUSIC, E. Mechanisms of resistance in Enterobacteriaceae towards betalactamase antibiotics. *Acta Medica Croatica*. 2004, Vol. 58, N° 4, p. 307-12.

TZOUVELEKIS, L. and BONOMO, R. SHV-type beta-lactamases. *Current Pharmaceutical Design*. 1999, Vol. 5, N° 11, p. 847- 64.

VILA, J., MARTI, S., SANCHEZ-CESPEDES, J. Porins efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2007, Vol. 59, N° 6, p. 1210-5.

<https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/Blees.pdf>